

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología III
(Medicina y Cirugía Bucofacial)



**BIOACTIVIDAD DE CEMENTOS FOSFATOS CÁLCICOS
SUSTITUIDOS CON ESTRONCIO Y SU APLICACIÓN EN
REGENERACIÓN ÓSEA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mohammad Hamdam Ali Alkhraisat

Bajo la dirección de los doctores
Enrique López Cabarcos y Luis Blanco Jerez

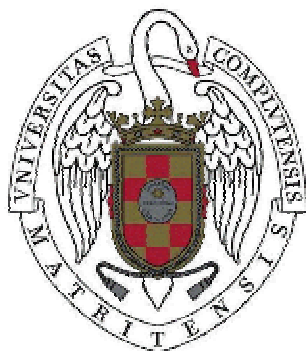
Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-1014-7**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Medicina y Cirugía Bucofacial



BIOACTIVIDAD DE CEMENTOS DE FOSFATOS CÁLCICOS SUSTITUIDOS CON ESTRONCIO Y SU APLICACIÓN EN REGENERACIÓN ÓSEA

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:

Mohammad Hamdan Ali Alkhraisat

Bajo la dirección de los Doctores:

Prof. Enrique López Cabarcos y Prof. Luis Blanco Jerez

A mis padres, hermanas y hermanos

Agradecimiento

A la Prof. Carmen Rueda por su gran apoyo y ayuda en orientar mi trabajo con su gran conocimiento científico y su personalidad tan accesible. A los doctores Faleh Tamimi Mariño y Jesús Torres, por su valioso consejo y ayuda para realizar los trabajos de la tesis. A mis compañeros de Laboratorio Juan Pablo, Marta y Marco. A los profesores del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid: Francisco Blanco, Begoña Elorza, Mariam Elorza, Conchita Arias, Pedro Galera, Conchita Civera y Jorge Rubio Retama. Al Prof. Rafael Baca Perez-Bryan del Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. A la Dra. Isabel Fernández Tresguerres. A los profesores del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid: Juan Torrado e Irene Martínez. A Los doctores del “Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Wurzburg, 97070 Wurzburg, Germany”: Uwe Gbureck, Andrea Eswald y Claus Moseke. A Isabel Bearman y Elke Vorndran. Al Dr. Fernando Conde López del servicio CAI de difracción de rayos X de la Universidad Complutense de Madrid. A mis directores de Tesis Doctoral Prof. Luis Blanco Jerez y Prof. Enrique López Cabarcos por poner a mi disposición los recursos técnicos y económicos necesarios para la realización del trabajo y por su ayuda en la selección del tema y las vías para su ejecución.

Esta tesis fue subvencionada con una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) del Ministerio de Asuntos Exteriores; por el proyecto de investigación MAT2006-13646-C03-01 del Ministerio de Educación y Ciencia, y por el programa CAM-UCM de “Consolidación de Grupos de Investigación” R45/05-14177 y CCG06-1093.

ÍNDICE

1. Abstract (English)	6
2. Hipótesis de trabajo	12
3. Objetivos	14
4. Nomenclatura	16
5. Introducción	20
6. Revisión bibliografica	24
6.1 Hueso	25
6.2 Materiales de sustitución ósea	35
6.3 Estroncio	79
7. Materiales y Métodos	82
7.1 Materiales y reactivos	83
7.2 Métodos	88
8. Resultados y discusión	106
8.1 Cohesión de COFC de brushita	107
8.1.1 Resultados	109
8.1.2 Discusión	133
8.2 Cementos de brushita modificados con estroncio	137
8.2.1 La adición de sal de estroncio soluble en agua (SrCl ₂)	139
8.2.1.1 Resutados	140
8.2.1.2 Discusión	152
8.2.2 Cementos óseos de fosfato cálcico preparados con β -TCP sustituido por estroncio	155
8.2.2.1 Resultados	157
8.2.2.2 Discusión	174
9. Conclusions (English)	177
10. Bibliografía	180
11. Abreviatura	200
12. Trabajos derivados de la tesis	203
12.1 Journal of Biomedical Materials Research-Part A	204
12.2 20th European Conference on Biomaterials	213
12.3 Acta Biomaterialia	215
12.4 8th World Biomaterials Congress	223
12.5 Submitted to Biomaterials	225

1. Abstract

The use of bone grafts in the repair of defects in dentistry has a long history of success, primarily with the use of autologous bone. With increasing technologic advances, researchers have been able to broaden the spectrum of grafting materials to allografts, xenografts, and synthetic materials. Osteoconductive and biocompatible calcium phosphate bone substitutes are widely used for the treatment of osseous defects caused by infection, tumors and trauma. A bone graft to function adequately must have a sufficient strength to withstand applied stresses and good cohesion, especially, when used in highly blood-perfused regions. Calcium phosphate cements are being used as bone graft substitutes. They are classified into hydroxyapatite and dicalcium phosphate dihydrate (DCPD or brushite) cements according to their final product. These cements are too weak to be used in load bearing areas, even though hydroxyapatite cements are stronger than brushite cements. However, brushite is metastable under physiological conditions and, *in vivo* studies have shown that brushite cement is highly resorbable. Brushite crystal-growth inhibition results in smaller crystals size allowing them to pack closely together and improving brushite cement mechanical properties. Furthermore, increasing brushite cement density improves the cement mechanical properties by reducing the cement porosity that is inversely proportional to the cement strength. This can be achieved by increasing the conversion of β -tricalcium phosphate (β -TCP) to brushite during the cement setting reaction.

Different *in vivo* studies demonstrated that brushite cements are biocompatible, bioresorbable and osteoconductive. However, the degradation of brushite cements has been scarcely studied even though it may be of great concern for clinical applications in highly blood-perfused regions. The objective of this work is to elucidate factors that determine brushite cement surface disintegration. For that, brushite cements were modified using in their preparation different aqueous solutions of phosphoric, glycolic, tartaric and citric acids in concentrations that were reported to improve the cement properties. Two viscosity-enhancing polysaccharides, chondroitin 4 sulfate and hyaluronic acid were also assayed. Thereafter, pre- and set cement samples were immersed in distilled water for 24 hours. Thenceforth, cement-solid weight loss, microstructure, liquid phase viscosity, mean size and zeta potential of the released particles were analyzed using X-ray diffraction, FTIR spectroscopy, light scattering, scanning electron microscopy, and optical microscopy. It was found that the particles released from the cement surface were β -TCP, and their amount depends on the

carboxylic acid used in the preparation of the cement. The addition of hyaluronic acid and chondroitin 4 sulfate decreased the amount of released particles from the surface of the set brushite cement made with citric acid. Furthermore, the hyaluronic acid increased significantly the viscosity of the citric acid solution and the cement paste prepared with this liquid phase showed a pronounced step down in particle release.

Furthermore, the use of carboxylic acids and silicate gel to set brushite cements resulted in a more rapid pH changes of the cement paste and a shorter final setting time (FST). We hypothesize that the silanol group (Si-OH) of the silicate gel could bind calcium ions and serve as nucleus for DCPD precipitation catalyzing cement's setting reaction. The use of silicate gel was therefore efficient in improving brushite cement cohesion. We showed that water solubility of calcium carboxylate, FST and viscosity of the mixing liquid may dictate the superficial disintegration of brushite cements.

Under physiological conditions, the metastable brushite phase transforms into hydroxyapatite (HA). Several factors were found to condition the *in vivo* DCPD transformation into HA like local interstitial liquid turn over, its protein constituents, and cement sample size. This undesirable transformation leads to increase the acidity of the surrounding medium and retards cement resorption. Low water soluble magnesium salts were proven to inhibit the growth of the newly forming HA crystal nuclei and pyrophosphoric acid was also reported to inhibit HA formation. α -hydroxy acids have been used as inhibitors to the setting reaction of resorbable brushite calcium phosphate cements. This study was conducted to determine the effect of α -hydroxy acids on the conversion of DCPD to HA.

The FST of brushite cements set with carboxylic acids was higher than brushite cements set with water or phosphoric acid. These cements were aged in phosphate buffer solution for 1, 3, 14 and 28 days. Ageing medium pH converged from 5.1-6.8 after one day to pH 7.1-7.2 and never dropped more than pH 7.05 throughout the observation periods. Furthermore, hydroxyapatite appeared as soon as 14 days in DCPD cements set with water and phosphoric acid, but it was not observed in DCPD cements set with glycolic, tartaric and citric acids till after 28 days. The maintenance of an appropriate pH (pH > 7) and the ageing medium renewal, to have persistent calcium ions release from brushite crystals, are factors that promote DCPD conversion to HA. However, these conditions did not result in an earlier appearance of HA within the cement matrix.

Brushite is a hydrated secondary calcium phosphate that upon heating suffers a dehydration process at around 130 °C accompanied with phase transformation to monetite (DCPA) at 160 °C followed by decomposition of DCPA to calcium pyrophosphate ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) at 425 °C. It was found that brushite dehydration and DCPA decomposition occurred at lower temperatures in cements set with phosphoric acid and water. The calculated enthalpy necessary for its dehydration was higher in brushite cement modified with tartaric acid > glycolic acid > citric acid > water > phosphoric acid. Hydroxyapatite started to appear in water and phosphoric acid brushite cements earlier than in carboxylic acid brushite cements. Through calcium-carboxylate complexation, carboxylic acids could inhibit the formation of HA and it was proven that the addition of citric acid to β -TCP/ MCP mixtures also prevented the formation of monetite.

Chondroitin 4 sulphate (C4S) has an anti-inflammatory effect and increases the regeneration ability of injured bone. Brushite cement set with 1M glycolic acid-2% C4S was implanted *in vivo* to evaluate its efficiency in bone regeneration. The results showed the resorption of brushite cement granulate through dissolution and macrophage activity. The higher amount of residual graft in the C4S group is a result of C4S adsorption on brushite granulate through calcium ions complexation with carboxylate and sulfate groups of C4S, inhibiting their dissolution. Even though, the new bone formation is slightly higher in the C4S group, compared with glycolic brushite cement control group, these differences were not statistically significant.

There is an increasing interest in the incorporation of strontium in calcium phosphate cements that stems from its good results in treating osteoporosis. Fractures caused by osteoporosis result in an estimated annual cost to the health services of around 30 billion euros in Europe. The beneficial effects of strontium arise from its capacity to prevent bone loss since it was demonstrated that Sr^{2+} ions decreased *in vitro* the differentiation and the resorbing activity of osteoclasts. In addition, Sr^{2+} increases osteoclast apoptosis and enhances preosteoblastic cell proliferation and collagen synthesis. Consequently, Sr^{2+} ions depress bone resorption and maintain bone formation. Extensive ion substitutions can occur in a crystal if the valence of the replacing ion is within one unit of that of the ion being replaced and if the radii of the ions are similar. Calcium and strontium fulfill both requirements and the two ions can occupy the same site in a

crystal forming solid solution. Herein, we report the synthesis of strontium-containing brushite cement with good cohesion and mechanical properties. For that, two approaches were developed: i) the addition of water soluble strontium salt, and ii) the use of strontium substituted β -TCP.

In the first approach, the cement powder, composed of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and monocalcium phosphate (MCP) was adjusted by different concentrations of strontium chloride and/or sodium pyrophosphate. The cement liquid phase was 2M phosphoric acid and 1M glycolic acid. The cement cohesion and mechanical properties were measured after samples ageing in water for 24 h at 37 °C. The incorporation of strontium ions increased the cement FST but not the diametral tensile strength (DTS) of brushite cements set with either phosphoric acid or glycolic acid. The Sr^{2+} ions had a negative effect on brushite cement cohesion.

It was also found that pyrophosphate ions inhibit the cement setting reaction and increased significantly the DTS of brushite cements. When strontium and pyrophosphate ions were added simultaneously, they increased the FST of brushite cements set with phosphoric acid. However, the SrCl_2 increase from 5% to 10% (w/w) reduced significantly the FST at pyrophosphate concentrations equal or higher than 2.16% (w/w). Furthermore, the brushite cement prepared with a Sr^{2+} content of 5% (w/w) had the highest DTS values, however, the DTS values of Sr-containing cements were significantly reduced as pyrophosphate concentration was higher than 2.16 % (w/w).

In the second approach for strontium substitution in brushite cements, strontium substituted β -TCP with the general formula $\text{Ca}_{(3-x)}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_2$ ($0 < x < 1$) was synthesized by calcination of powder mixtures with the appropriate stoichiometry. Sr-substituted β -TCP induced strontium substitution in the setting products and favoured the formation of monetite (CaHPO_4) as setting product, whereas Sr-free cements set to brushite ($\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$). Monetite forming cements present the advantages of providing a longer setting time, a better mechanical performance and a less exothermic setting reaction. Release experiments under dynamic conditions for up to 15 days revealed the release of Sr^{2+} doses in the range of 12-30 ppm with a zero order kinetic. Cement biocompatibility was investigated *in vitro* by culturing human osteoblast cell line hFOB1.19 on cement surfaces. Biocompatibility test proved that Sr-containing cements

are as good as Sr-free cements in providing a template for cell growth and function. The differences in cell activity and proliferation between Sr-free cement and Sr-containing cements were not statistically significant. Furthermore, the osteoblast cell morphology showed the good adaptation of the cells on cement surfaces, thus, indicating the Sr-containing cements suitability for osteoblast cell growth and proliferation.

Keywords: Biocompatibility; brushite; bone cement; bone regeneration; calcium phosphate; cement ageing; chondroitin 4 sulphate; cohesion; compressive strength; diametral tensile strength, disintegration, hyaluronic acid; hydroxyapatite; ionic substitution; monetite; osteoblast; phase transformation; pyrophosphate; silicate gel; strontium.

2. Hipótesis de trabajo

2. Hipótesis de trabajo

En este trabajo se parte de la hipótesis de que mediante la modificación de la fase líquida de los cementos de brushite se pueden controlar sus propiedades físico químicas y mecánicas con objeto de obtener un cemento capaz de mantenerse como una sola pieza en un medio acuoso. Esta propiedad, al evitar la desintegración del material tendría un gran impacto en su aplicación en zonas de alto suministro sanguíneo. Además, la adición de sustancias como glucoaminoglicano para mejorar la cohesión del cemento puede influir en el comportamiento *in vivo* del biomaterial particularmente en su velocidad de reabsorción.

Una segunda hipótesis consiste en que la modificación de los cementos basados en brushita con iones de estroncio puede aumentar la solubilidad de los cristales de brushita afectando las propiedades químico-físicas y biológicas del cemento permitiendo una mayor liberación de los iones de estroncio que en los biomateriales basados solo en hidroxiapatita. La incorporación de estroncio no debe alterar las propiedades mecánicas de los cementos ni comprometer su biocompatibilidad.

3. Objetivos

3. Objetivos

1. Desarrollar un método que permita estudiar la cohesión de los cementos de brushita y su aplicación para identificar los factores que influyen en la cohesión de estos cementos.
2. Estudiar la transformación de brushita a hidroxiapatita y comprobar la eficacia de los ácidos carboxílicos en la inhibición de esta transformación de fase y en la cohesión del cemento.
3. Comprobar la regeneración ósea conseguida *in vivo* con un cemento de brushita con mejor cohesión usando conejos como modelo de experimentación animal.
4. Inducir la sustitución iónica de los iones de calcio por iones de estroncio en el cristal de brushita por precipitación en un sistema de cemento utilizando dos métodos: la adición de una sal soluble de estroncio o el uso de un reactante sustituido por estroncio.
5. Evaluar el efecto de los iones de estroncio, incorporados en el cemento siguiendo los dos métodos anteriormente mencionados, en las propiedades químico-físicas del cemento de brushita.
6. Estudiar la biocompatibilidad *in vitro* del cemento modificado con estroncio utilizando una línea celular de osteoblastos.

4. Nomenclatura

Biomaterial

La Asociación Europea de Biomateriales lo define como “material no vital que se utiliza en aplicaciones médicas con la finalidad de obtener una interacción con un determinado sistema biológico” [1]. Este material puede ser de origen natural o sintético, o combinación de ambos y puede implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un tejido, órgano o función.

Biocompatibilidad

Es la capacidad de un material de ser utilizado en una aplicación específica con una respuesta adecuada del tejido receptor [2]. Esta capacidad esta caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes.

Bioactividad

Capacidad de un material para inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor. Así, un material bioactivo es aquel que posibilita una respuesta biológica específica en su relación con los tejidos favoreciendo el enlace de ambos [3].

Bioinercia

Ausencia de reacción de los tejidos vivos frente a cualquier material biocompatible después de su implantación en el organismo. Sin embargo, en algunos casos puede presentarse una mínima respuesta inmunológica [4].

Bioabsorbible

Condición de ciertos biomateriales que, después de ser implantados en un tejido del organismo, experimentan fenómenos de disolución en los fluidos corporales [5].

Biodegradación

Descomposición, rotura o lisis de un material mediada por un sistema biológico, que se produce como consecuencia de la actividad celular, enzimática, bacteriana o viral, concluyendo con su desaparición [6].

Bioreabsorbible

Condición que poseen algunos biomateriales de degradarse en componentes de menor peso molecular, ya sea a través de las vías metabólicas u otras rutas alternativas del organismo [7].

Injerto

Tejido u órgano que después de ser separado de su origen se inserta en un lugar del organismo, ya sea en el propio, en el de otro de la misma especie o en el de otra especie. Se caracteriza por, que una vez implantado, se puede rehabilitar y se mantiene vital gracias a los tejidos vivos del receptor [8].

Osteoconducción

Propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor [9].

Osteogénesis

Desarrollo y formación de tejido óseo a partir de células osteoformadoras como los osteoblastos [10].

Osteoinducción

Capacidad de un material para promover la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento [11].

Osteointegración

Establecimiento de una continuidad fisico-química entre un implante y la matriz ósea sin interposición de tejido fibroso. También corresponde a la condición en que un injerto colabora en la neoformación ósea en base a la presencia de células mesenquimales. Este tipo de aporte celular es máximo en el autoinjerto óseo [12].

Osteotransducción

Función que combina las propiedades de biodegradabilidad selectiva y activa, y de osteoconducción. Así, se produce una verdadera transformación del material que en la medida que es degradado entra a formar parte del proceso de neoformación ósea [13].

Sinterización

Procedimiento de producción de biomateriales cerámicos a partir de conglomerados de polvos previamente modelados, que luego son sometidos a calentamiento en hornos especiales, en el rango de los 1.000 a 1.500 °C, lo que provoca la fusión parcial de los componentes que, de esta manera, quedan soldados [14].

Calcinación

Proceso de calentar una sustancia a altas temperaturas provocando su decomposición térmica.

5. Introducción

La primera generación de biomateriales tenía como objetivo desarrollar un material tolerable por el cuerpo y con propiedades mecánicas suficientes para soportar las sobrecargas fisiológicas. Aunque estos materiales proporcionan una solución eficaz a corto plazo, su eficacia esta limitada a largo plazo. Esta limitación ha levantado el interés de la comunidad científica por la bioactividad, que define el efecto de un agente en un organismo o tejido viviente, y este concepto ha sido la clave para proponer una segunda generación de biomateriales. El desarrollo de una segunda generación de biomateriales bioactivos en vez de bioinertes depende de que la reacción interfacial implante-tejido sea controlada por los procesos celulares normales. Esta estrategia permite el diseño de un biomaterial específico para una aplicación clínica particular y es un ejemplo de ingeniería tisular *in situ* adecuada para el desarrollo de sustitutos óseos [15].

La venta de productos ortopédicos a escala mundial se aproximó a los \$15 billones en 2001 y sigue creciendo a una tasa anual de 13% [16]. Los injertos óseos con un coste de \$1 billón representaron 408 000 procedimientos en Europa y 605 000 procedimiento en EEUU [16]. En el periodo de 2002-2003, entre los 617 000 procedimientos quirúrgicos que incluyen hueso y articulación registrados por los servicios médicos nacionales en Inglaterra se han realizado mas de 77 000 cirugías primarias de cadera. Este aumento en la cirugía reconstructiva se debe principalmente al incremento anual del 2 al 3% en la población global con edad mayor de 65 años provocando un aumento de 100 000 000 de personas en el periodo de 2000-2010. La demanda de biomateriales ortopédicos también es el resultado de cambios de estilo de vida con expectativas de mayor calidad de la misma, de avances en las técnicas quirúrgicas (cirugía mínimamente invasiva), y avances tecnológicos (innovación en los biomateriales) que generan nuevas aplicaciones.

En la medicina actual el sustituto óseo estándar es el injerto óseo autólogo que, sin embargo, presenta algunos problemas como la insuficiente cantidad de injerto, mayor tiempo quirúrgico, pérdida sanguínea, un costo adicional y riesgo de morbilidad posquirúrgica significativa en la zona donante de hasta 30 % provocada por infección, dolor, hemorragia, debilidad muscular y lesión neurológica. Una alternativa pueden ser los aloinjertos de los bancos de hueso. Sin embargo, esta alternativa sufre limitaciones de tasa de éxito y un riesgo de transmitir enfermedades. [17-19] Debido a lo anterior

existe una demanda alta de sustitutos óseos sintéticos que ofrecen un material sin limitaciones de cantidad y una solución de los problemas mencionados anteriormente.

Entre los sustitutos óseos sintéticos destacan las biocerámicas de fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico- β que son biocompatibles, bioactivas y osteoconductoras. Sin embargo, sufren las desventajas de que solo están disponibles en forma de bloques o granulados. Los bloques prefabricados tienen tamaños y formas preestablecidos, y es difícil su adaptación al sitio de implantación; mientras que las partículas de los granulados tienden a migrar del sitio de implantación, aumentando la posibilidad de complicaciones, especialmente en zonas con alto suministro sanguíneo, e incluso el fracaso del procedimiento quirúrgico.

En 1980s, Brown y Chow descubrieron e introdujeron la idea de un nuevo material de sustitución ósea los “Cementos Óseos de Fosfatos de Calcio” (COFC), objeto de este trabajo, son materiales compuestos por un polvo y un líquido que al ser mezclados en proporción adecuada forman una masa plástica y moldeable que gradualmente endurece. El endurecimiento de estos cementos es el resultado de reacciones que producen la formación de una fase cristalina de fosfato de calcio biocompatible y osteotransductora. La idea de los COFC es sencilla y permite la producción de implantes óseos con dimensiones y formas imposibles de lograr por los métodos cerámicos convencionales. Además, permite la incorporación de diversos medicamentos a matrices portadoras de COFC resultando en una acción terapéutica localizada en el sitio de implantación.

Los COFC se clasifican en dos categorías principales dependiendo del producto final de la reacción de fraguado: Cemento de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{pH} > 4.2$) y cemento de brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH} < 4.2$). Los cementos de hidroxiapatita son más fuertes y los cementos de brushita son más reabsorbibles en condiciones fisiológicas.

A pesar de las ventajas antes mencionadas, los COFC sufren de las siguientes inconvenientes: una resistencia mecánica relativamente baja, y tiempos de fraguado o endurecimiento en ocasiones inadecuados. La disponibilidad de COFC con resistencia mecánica próxima a la resistencia del hueso esponjoso humano y con tiempos de fraguado adecuados, aumentaría considerablemente el campo de aplicaciones

potenciales de estos materiales, en la actualidad limitado a la odontología, la cirugía maxilofacial, y la reparación de fracturas en los miembros superiores. Los materiales basados en hidroxiapatita son poco solubles en condiciones fisiológicas lo que puede comprometer su función en la liberación de iones y reactivos bioactivos [13].

Se ha demostrado que los iones de estroncio tienen un efecto positivo en el tratamiento de osteoporosis. Este efecto se debe a la estimulación de osteoblastos y la inhibición de los osteoclastos junto con la estimulación de la producción del colágeno. La incorporación del estroncio ha mejorado la bioactividad de los materiales basados en HA. Sin embargo, la baja solubilidad de estos biomateriales y la inhibición de los osteoclastos (responsables de su biodegradación) comprometen su eficacia en la liberación de iones de estroncio a los tejidos en el sitio de la implantación. Hasta ahora no se ha estudiado la modificación de los cementos basados en brushita con iones de estroncio y como afecta el estroncio a sus propiedades químico-físicas y biológicas y su eficacia como matrices portadores de iones de estroncio.

A continuación se revisan las principales características del hueso como biomaterial y de los sustitutos óseos que se utilizan para reemplazarlo.

6. Revisión bibliografica

6.1 HUESO

El hueso es un tejido denso y multifásico constituido por células rodeadas de una matriz de componentes orgánicos (fibras de colágeno, lípidos, péptidos, proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y citratos) e inorgánicos (fosfatos cálcicos, carbonatos, sodio, magnesio, flúor) [20]. La variación en la estructura y los componentes del hueso dan lugar a distintos tipos de hueso que se diferencian por sus características mecánicas y funcionales [21]. El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado duro y elástico que proporciona soporte y protección a los órganos, responsable del mantenimiento de homeostasis mineral y fuente de células troncales hematopoyéticas. Por lo tanto, el tejido óseo está involucrado en un ciclo constante de resorción y formación (remodelado óseo) controlado por la regulación hormonal y las necesidades mecánicas.

Estructura macroscópica

Los huesos maduros poseen una estructura macroscópica común y están constituidos por tejido óseo esponjoso o trabecular, que representa alrededor del 20.0 % del volumen total del hueso, que se encuentra en continuidad con el tejido óseo cortical o compacto, que corresponde aproximadamente al 80.0 % del volumen total del hueso. La superficie de los huesos consta de hueso cortical y el espesor de esta capa aumenta en zonas de alta carga mecánica.

Hueso esponjoso o trabecular

El hueso esponjoso posee una red de espículas ramificadas o trabéculas que limitan espacios ocupados por la médula ósea. Se encuentra en el esqueleto axial, las epífisis y metáfisis de los huesos largos y en los huesos planos. El hueso esponjoso tiene la capacidad de resistir fuerzas de compresión y tensión [22]. Las propiedades mecánicas del hueso esponjoso dependen del grado de porosidad y la arquitectura de las trabéculas. Ambos factores varían según el sitio anatómico [23] y la edad [24]. La anisotropía del hueso esponjoso resulta de la orientación de las trabéculas de mayor tamaño en las líneas principales de estrés.

Hueso cortical o compacto

El hueso cortical predomina en el esqueleto apendicular, conformando la diáfisis de los huesos que adopta la forma de un cilindro hueco para contener la médula ósea. Sus particulares características lo hacen resistente a las fuerzas de flexión, torsión y cizalla [22].

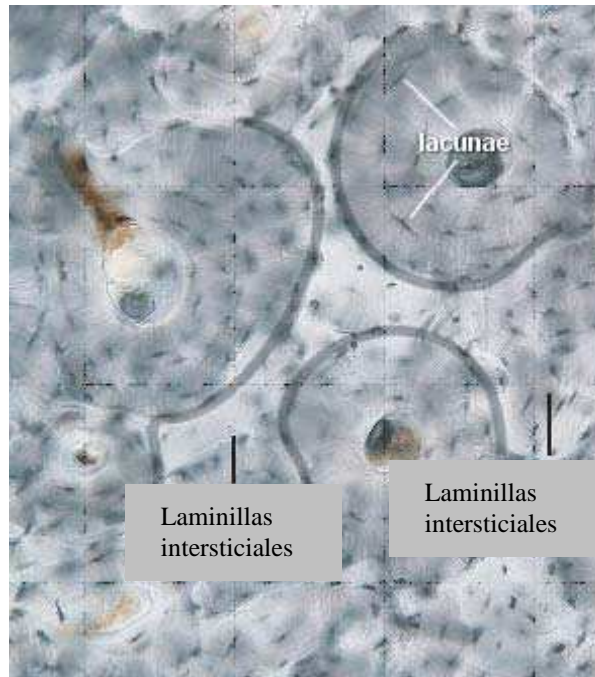


Figura 1. La estructura microscópica del sistema haversiano en hueso cortical [25].

La matriz ósea mineralizada del hueso cortical se dispone en laminillas individuales. La mayoría de estas laminillas se estructuran concéntricamente alrededor de un canal longitudinal vascular llamado canal de Havers, que contiene capilares, vénulas postcapilares y a veces arteriolas. Entre estas laminillas se ubican lagunas que contienen los osteocitos. Esta estructura cilíndrica se llama la osteona o el sistema haversiano. De cada laguna se irradian canalículos ramificados que permiten la comunicación y la nutrición de los osteocitos (Figura 1).

Las laminillas intersticiales no pertenecen a ningún sistema haversiano sino que se ubican entre los sistemas haversianos. Las laminillas circunferenciales y las endosteales están orientadas paralelamente a la superficie externa e interna del hueso. Por debajo del periostio y el endostio, respectivamente.

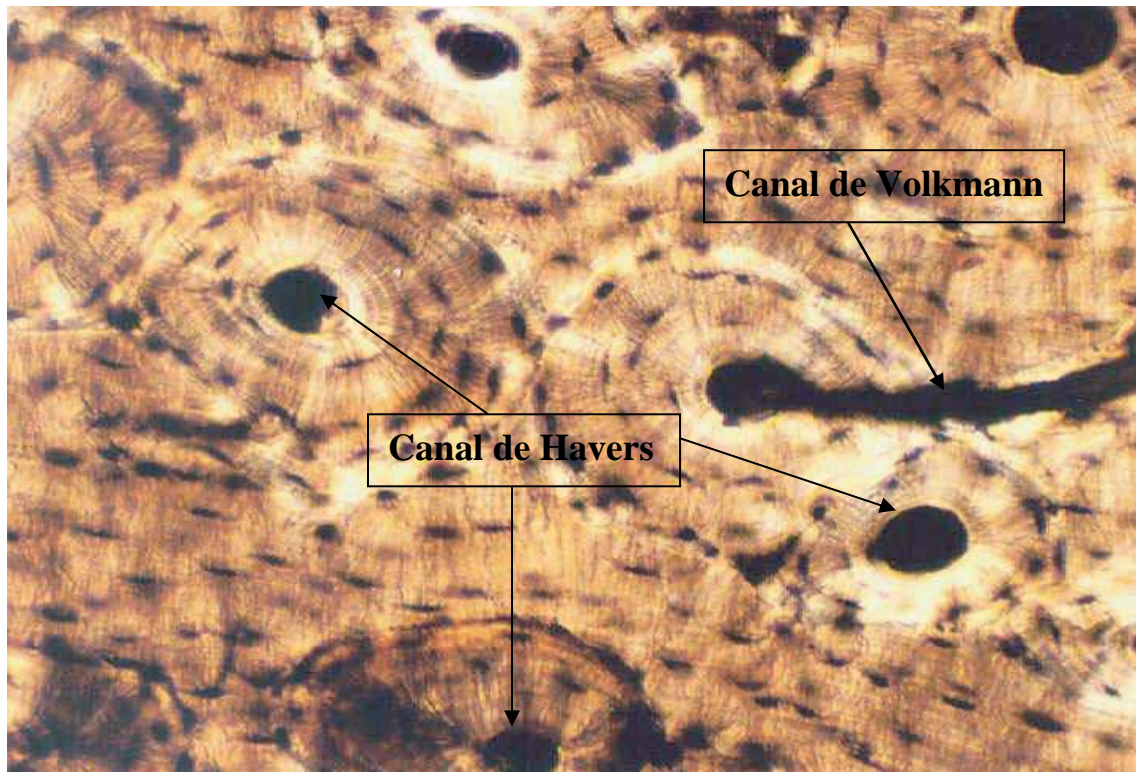


Figura 2. El Canal de Volkmann se comunica con el canal de Havers en un osteon [25].

Los canales de Volkmann son un segundo sistema de canales que penetran el hueso de manera aproximadamente perpendicular a su superficie. Estos canales conectan los canales de Havers con la superficie interna y externa del hueso. Así, los vasos en los canales de Volkmann comunican los vasos en los canales de Havers con los vasos del endostio. Existen también algunas comunicaciones con los vasos del periosteo (Figura 2).

Componentes del hueso

En la discusión de los componentes del hueso, hemos seguido el diagrama mostrado en la figura 3 dónde hemos clasificado estos componentes en dos categorías principales; matriz extracelular y componente celular.

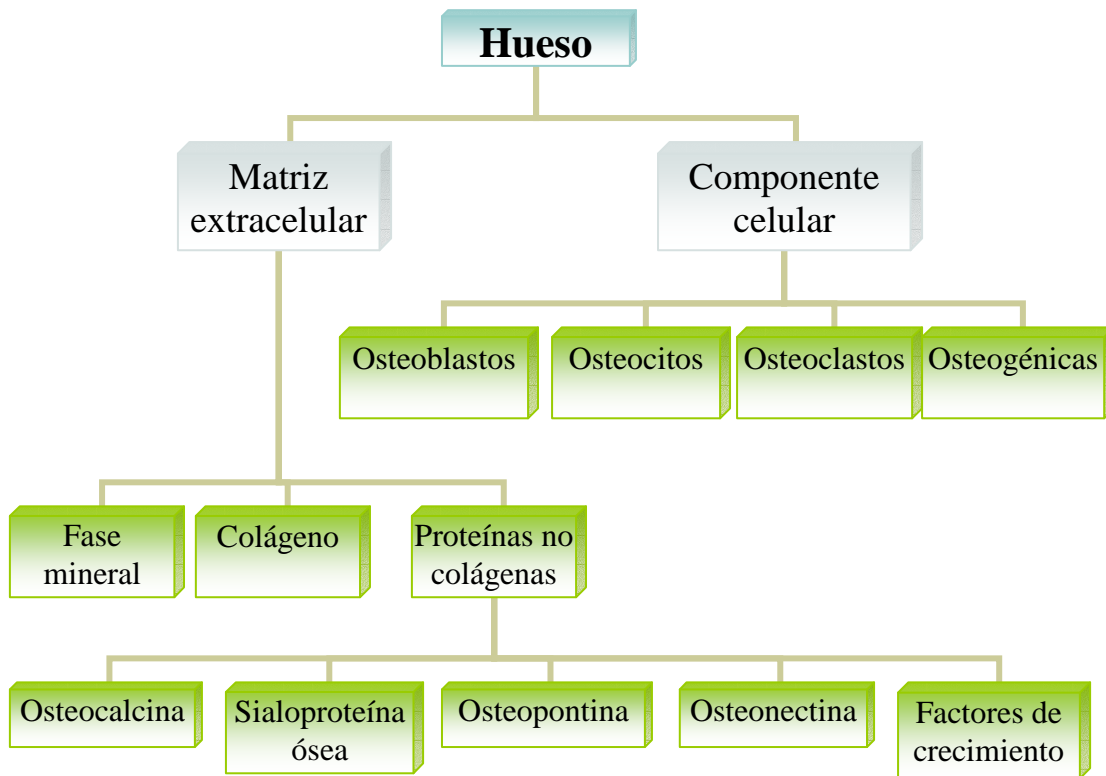


Figura 3. Diagrama orientativo de los componentes principales del hueso discutidos en este apartado.

Matriz extracelular

La matriz extracelular consta de dos componentes principales que forman *ca.* 95% del peso seco del hueso: las fibras orgánicas de colágeno y cristales inorgánicos. Además, la matriz esta compuesta de otras sustancias orgánicas conocidas como proteínas no colágenas y sales inorgánicas amorfas o poco cristalinas. Esta arquitectura de fibras de colágeno muy organizada reforzada con cristales inorgánicos resulta en un tejido elástico y duro.

La fase mineral del hueso

La fase inorgánica del hueso esta constituida principalmente de hidroxiapatita deficiente en calcio, fosfato y grupos hidroxilo. La relación Ca:P oscila entre 1.37-1.87 [26]. Además, se observa sustitución iónica de elementos traza como magnesio, estroncio, flúor y carbonato en la estructura del cristal de apatita. Estas diferencias resultan en una apatita lo suficientemente insoluble para ser estable y suficientemente reactiva para

permitir la resorción y la formación constantes de cristales de 5-100 nm de diámetro. Se cree que la mineralización ocurre en vesículas matriciales sin embargo existen discrepancias entre los investigadores sobre el mecanismo. [21] Generalmente, los osteoblastos controlan la formación de fosfato cálcico amorfo, con relación Ca:P de 1.44-1.55, que sirve como una reserva y núcleo para el crecimiento de hidroxiapatita [26]. Otras sustancias orgánicas presentes en la matriz pueden ser involucradas en la promoción de la nucleación y la precipitación de bio-apatita y en la regulación de la orientación, el tamaño y la tasa de crecimiento de los cristales.

Colágeno [21]

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y se encuentra en varios tejidos conjuntivos calcificados y no calcificados. El colágeno constituye el 70-90% del componente no mineral del hueso. La unidad estructural del colágeno, el tropocolágeno, es una molécula rígida y alargada (300 nm de longitud, 1.5 nm de espesor) formada por una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas α dispuestas sobre un eje común. Las cadenas α tienen la secuencia glicina (GLy)-X-Y. Se producen distintos tipos de colágeno mediante la combinación de distintas cantidades y secuencias de otros aminoácidos dentro de la molécula tropocolágeno. Hasta ahora, se conocen 13 tipos distintos de colágeno.

El colágeno tipo I es la forma mas abundante y cuenta el 90% del colágeno en el cuerpo. El hueso tiene mayoritariamente colágeno tipo I y una poca cantidad de colágeno tipo V. Los colágenos tipo I y V se organizan en fibrillas con estriación característica que se repite cada 55-75 nm, con promedio de 64 nm. Las fibrillas tienen un diámetro entre 40 y 120 nm, con promedio de 100 nm. Las fibrillas se organizan en haces formando las fibras de colágeno que tienen diámetro entre 0.2 y 12 μ m.

Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas constan de mucopolisacáridos ácidos, entre los que destacan la osteocalcina, la sialoproteína ósea, la osteopontina y la osteonectina. La osteocalcina y la sialoproteína ósea son específicas para el hueso. Estas proteínas se sintetizan por las células óseas y se ven involucradas en regular la mineralización y el remodelado óseo.

Dichas proteínas son multifuncionales y su control esta mediado por el efecto “feedback” en los osteoblastos [27].

Osteocalcina

La osteocalcina (OC) contribuye el 20% de las proteínas no colágenas del hueso. La OC tiene una afinidad alta a la HA y se adhiere a su superficie mediante la orientación de los residuos del ácido carboxiglutamico (Gla) con los iones de calcio [27]. La OC es un inhibidor potente de la formación de HA y actúa como retardante de la nucleación de HA [28]. Recientemente se ha descrito que la OC actúa en la regulación del remodelado óseo a través de la inhibición de la formación ósea por parte de los osteoblastos [27]. La expresión de la OC está controlada por hormonas reguladas por Ca^{2+} .

Sialoproteína ósea

La sialoproteína ósea (SP) es una sialoglicoproteína ácida que contribuye el 15% de las proteínas no colágenas del hueso y esta involucrada en la mineralización y el remodelado óseo [29]. La función de la SP en promocionar la diferenciación de osteoblastos y la resorción ósea esta relacionada con su concentración [29]. Se ha mostrado que la concentración de SP es alta en zonas de formación ósea y que el tratamiento de los osteoclastos con SP inhibe la reabsorción ósea [29]. Estudios *in vitro* han mostrado que la SP promociona la adhesión de osteoblastos por tener la secuencia Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) que es el mínimo requisito estructural para la adhesión celular [30]. SP tiene afinidad alta por la HA y se ha demostrado que promociona la nucleación de HA [28].

Osteopontina

La osteopontina (OP) es una glicoproteína ácida y fosforilada presente en varios tejidos. La OP es un inhibidor potente de la formación de HA mediante la inhibición del crecimiento cristalino [28]. Este efecto inhibidor depende del nivel de fosforilización y la densidad de la carga negativa de manera que la adhesión de OP a la superficie de HA impide la incorporación de más iones inhibiendo su crecimiento cristalino [31]. La OP tiene la secuencia RGD que promociona la adhesión celular y esta involucrada en la regulación de la movilidad de osteoclastos en la resorción ósea [27]. Además, La OP esta implicada en la regulación de calcificación ósea y ectópica [31].

Osteonectina

Los osteoblastos sintetizan la osteonectina (ON) y su presencia en el hueso es variable y no específica. Debido a esa variabilidad, el papel de la ON en la formación ósea no está claro. Se ha mostrado que la ON a alta concentración inhibe el crecimiento de cristales de HA [28]. Estructuralmente, la ON es un polipéptido formada por solo una cadena que tiene dos segmentos abundantes en glutamato que pueden acomplejarse con los iones de Ca^{2+} lo que explica su fuerte adhesión a HA [32]. La ON se une a otras proteínas de la matriz extracelular incluyendo los colágenos tipo I y V. Además, la ON une e inhibe la extensión de células endoteliales y células de músculo liso [33]. Por ello, se cree que la ON está involucrada en interacciones célula-matriz facilitando cambios en la forma celular y el despegamiento de las células de la matriz.

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son péptidos que regulan el crecimiento, la función y la movilidad celular resultando en la formación de nuevo tejido. Los factores de crecimiento óseo influyen en la síntesis de hueso nuevo actuando sobre una población local de células de la médula ósea y la superficie del hueso.

La influencia de los factores de crecimiento en la síntesis ósea está mediada por: i) su efecto regulador del crecimiento y la función de los osteoblastos, ii) la inducción de angiogenesis (vascularización) como el factor de crecimiento básico de fibroblastos 1 y 2 (bFGF-1/2) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o iii) la inducción de la osteogenesis; promoción de la migración y diferenciación de células endoteliales y osteoprogenitoras [34]. La matriz ósea cuenta con alto contenido de factores de crecimiento tales como los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), el factor de crecimiento de insulina tipo I y II (IGF-I, IGF-II), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), y la familia de factores de crecimiento transformante-beta (TGF- β) que tiene más de 43 miembros incluyendo TGF- β 1-5 y la proteína morfogénica ósea, BMP 2-16 [35]. Las proteínas de la superfamilia de TGF- β regulan distintos procesos biológicos como el crecimiento celular, la diferenciación celular y la formación de patrones embriogénicos [36]. Los BMPs juegan un papel fundamental en modular la diferenciación mesenquimal induciendo la secuencia completa de la osificación endocondral de hueso donde el cartílago se sustituye por hueso [37]. Los BMPs se

diferencian en su potencia osteoinductiva, así se necesita más cantidad del BMP 5 que de BMPs 2 y 7 para formar la misma cantidad de hueso. Además, la actividad del recombinante humano BMP 2 (rhBMP 2) es la décima parte de BMP 2 humano [38]. Los recombinantes humanos BMPs se aplican *in vivo* a concentraciones mayores entre 0.7-17 µg BMP por mg de portador de colágeno, en comparación con los BMPs nativos. Esto indica que la actividad de BMP nativo es una suma de la actividad de los distintos BMPs. [39]

Componente celular del hueso

De las muchas células asociadas al hueso, tres son de gran interés: los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas células son responsables de producir, mantener y reabsorber el hueso, respectivamente. Dichas células diferenciadas son muy especializadas y generalmente no se proliferan.

Existen células menos diferenciadas de la misma línea celular que mantienen la población celular mediante su proliferación y diferenciación. Estas células se conocen como las células troncales y en la formación ósea se llaman células osteogénicas. Las células osteogénicas se originan en el linaje celular de las células mesenquimales de la medula ósea y existen en el endostio y el periostio [40].

Las señales bioquímicas estimuladas por el remodelado o la reparación de una fractura aumentan la población local de estas células. La vascularización del tejido es clave en la diferenciación de las células osteogénicas hacia condroblastos (que producen cartílago) u osteoblastos [41]. En zonas de alta vascularización, las células osteogénicas se diferencian en osteoblastos responsables de la formación ósea a su alrededor. Cuando un osteoblasto queda rodeado por matriz extracelular mineralizada, se diferencia en osteocito que nutre y mantiene el hueso local, y participa en la regulación de su remodelado. Sin embargo, en zonas de baja vascularización, como el caso de una fractura reciente, las células osteogénicas se diferencian en condroblastos. Cuando el cartílago rodea un condroblasto, esta célula se diferencia en condrocito que mantiene la matriz colágena hasta su reemplazamiento por tejido óseo [40]. Los osteoclastos se derivan de monocitos que se originan en las células troncales hematopoyéticas. Los monocitos por la influencia de citoquinas migran al sitio de la resorción ósea y se fusionan con otros monocitos o con un macrófago multinucleado y se diferencian en

osteoclastos especializados [42]. Los osteoclastos son células agresivas que se responsabilizan de la reabsorción ósea. Los monocitos y macrófagos participan también en la reabsorción ósea en procesos de remodelado y reparación ósea [43].

Reparación ósea

La reparación de lesiones óseas resulta en tejido óseo idéntico que no se puede distinguir del tejido original, lo que se conoce como regeneración ósea. Los patrones celulares y moleculares involucrados en la regeneración ósea son similares a los que desarrollan el hueso en el embrión [44].

En un embrión, la transformación a tejido óseo de una condensación (concentración) de células mesenquimales primitivas esta mediado por osificación intramembranosa o por osificación endocondral. En la osificación intramembranosa, las células mesenquimales se diferencian en células osteogénicas que dan lugar a osteoblastos, responsables de la formación directa del hueso. Sin embargo, en la osificación endocondral, la formación del hueso ocurre en dos pasos: la diferenciación de células mesenquimales en condroblastos que depositan una matriz colágena que se osifica mediante la actividad de los osteoblastos. El hueso formado por los dos mecanismos es indistinguible. El hueso de la calota y la mandíbula se forma mediante osificación intramembranosa mientras que el hueso del hombro, pelvis y las extremidades se forman mediante osificación endocondral.

La reparación de fracturas óseas ocurre mediante el mecanismo de osificación endocondral. Los cinco pasos de este mecanismo son:

- ❖ La lesión del tejido blando local y el periostio resulta en la formación de hematoma. Lo que supone una alteración del suministro sanguíneo.
- ❖ Este desorden en el suministro sanguíneo impide que lleguen a los osteocitos los nutrientes provocando su muerte. Esta muerte celular resulta en necrosis local del hueso alrededor de la fractura.
- ❖ Esta necrosis local inicia un reclutamiento de los macrófagos y fibroblastos para limpiar la zona del tejido muerto y la formación de una matriz extracelular, respectivamente. Además, se reclutan células troncales mesenquimales de la

médula ósea y el periostio que a su vez proliferan y diferencian en células osteogénicas.

- ❖ Esto provoca el aumento en espesor del periostio y la producción de los collares externos del callo de fractura. Las células osteoprogenitoras cerca del hueso no dañado tienen un suministro alto de oxígeno y se diferencian en osteoblastos que producen el osteoide que se calcifica rápidamente a hueso. Los osteoprogenitoras que no tienen un suministro de oxígeno adecuado, se diferencian en condroblastos formando cartílago. Simultáneamente, se induce la angiogénesis. Una vez formado el cartílago y estabilizada la fractura, los osteoclastos y células osteoprogenitoras invaden el callo cartilagenoso después de la formación capilar. Así, el cartílago se reemplaza por tejido óseo trabecular neoformado mediante osificación endocondral.
- ❖ El hueso trabecular neoformado se remodela en hueso lamelar y el proceso se completa con la formación de médula ósea normal rellenando los espacios del hueso esponjoso. La reparación de hueso compacto ocurre mediante el relleno de los espacios entre las trabéculas con capas sucesivas de hueso desarrollando nuevos canales haversianos.

6.2 MATERIALES DE SUSTITUCIÓN ÓSEA

Un sustituto óseo ideal tiene que cumplir con cuatro requisitos:

- ❖ Osteointegración: la capacidad del biomaterial de unirse químicamente al hueso sin formar una capa intermedia de tejido fibroso [45].
- ❖ Osteoconducción: la capacidad del biomaterial de apoyar el crecimiento óseo en su superficie [45].
- ❖ Osteoinducción: la capacidad del biomaterial de inducir la diferenciación de células troncales pluripotentes hacia osteoblastos [46].
- ❖ Osteogénesis: La formación de nuevo hueso por parte de osteoblastos presentes en la matriz del biomaterial [46].

Atendiendo a su origen podemos clasificar los injertos óseos como: autoinjerto, aloinjerto, xenoinjerto y los sustitutos óseos sintéticos.

El hueso autógeno es el sustituto óseo estándar que cumple con todos estos requisitos. Los aloinjertos cumplen con las propiedades de osteointegración, osteoconducción y osteoinducción pero no cumplen con la propiedad de osteogénesis debido a la carencia de células vivas. Los sustitutos óseos artificiales cumplen con las propiedades de osteointegración y osteoconducción.

Autoinjerto

El autoinjerto es un tejido u órgano que se separa de su origen y luego se inserta en otro lugar del propio organismo. El componente celular de los injertos autógenos de hueso esponjoso consta de las células que sobreviven al trasplante, pocos osteoblastos maduros y un número más alto de células precursoras [46 y 47]. El potencial osteogénico del injerto óseo autógeno se deriva de estas células precursoras.

Sin embargo, este sustituto óseo estándar sufre las siguientes limitaciones: aumentar el tiempo del procedimiento quirúrgico, restricciones en la cantidad y la forma del injerto, aumentar el riesgo de la morbilidad relacionada con la pérdida de sangre, complicaciones de la reparación del sitio quirúrgico, pérdida sensorial local y dolor crónico [48]. Se ha demostrado que el dolor en el área donante duró más de tres meses en hasta 15% de los pacientes donde la fuente del injerto óseo fue la cresta iliaca. La

agresividad del dolor puede relacionarse con la extensión de la disección necesaria para obtener el injerto [49].

Aloinjerto

El aloinjerto es un tejido u órgano que se separa de su origen y luego se inserta en otro organismo de la misma especie. Los aloinjertos presentan una alternativa a los autoinjertos pero no poseen la propiedad de osteogénesis. La actividad osteoinductora del aloinjerto se limita a su uso en forma granulada o desmineralizada. Los aloinjertos proporcionan un sustituto óseo sin limitaciones de cantidad y elude la morbilidad asociada a la segunda cirugía para obtener el autoinjerto. El uso de los aloinjertos está muy indicado para tratar defectos óseos grandes que requieren soporte estructural y cuando la cantidad del autoinjerto es insuficiente.

La fractura del aloinjerto (alrededor del 19%), el fracaso en lograr la unión con el huésped y la infección son complicaciones asociadas al uso de los aloinjertos [50]. El riesgo de la infección bacteriana aumento con el incremento en el tamaño del aloinjerto y puede ocurrir en más del 10% de los casos cuando se emplean cantidades masivas de aloinjerto. La transmisión vírica (hepatitis B y C, y VIH) es otro potencial de riesgo. A pesar del estricto control del historial del donante y las exploraciones serológicas, se ha reportado la transmisión de VIH 1 de un cadáver donante que era sero-negativo [51].

Xenoinjerto

El xenoinjerto procede de otra especie diferente. Como ejemplo podríamos citar el hueso de Kiel (hueso bovino desengrasado y desnaturalizado) o el colágeno de origen bovino en diferentes presentaciones (polvo, esponja, malla y fieltro). El Bio-oss (Geistlich Biomaterials) es posiblemente el biomaterial más estudiado como sustituto óseo en los últimos años.

El Bio-oss es un xenoinjerto óseo de origen bovino que presenta una área superficial interna de $79,7 \text{ m}^2/\text{g}$ [52]. Durante su proceso de fabricación se elimina la matriz orgánica sin alterar los microtúneles existentes entre los cristales de apatita, resultando en una matriz mineral remanente con cristales de aproximadamente 100 micras de diámetro que presenta propiedades químicas, morfológicas y ultraestructurales muy parecidas al hueso humano [53].

El Bio-oss es un material osteoconductor y su reabsorción es lenta [54 y 55]. La seguridad y la pureza de los materiales bovinos han sido un tema de debate durante los últimos años, sobre todo a raíz de los riesgos derivados de la posible transmisión de enfermedades como la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Sin embargo, la seguridad del Bio-Oss® ha sido demostrada en varios estudios mediante test de alta sensibilidad que confirmaron la ausencia de proteínas en este biomaterial lo que imposibilita la transmisión de cualquier enfermedad [56].

Injertos óseos sintéticos

La mayoría de los injertos óseos sintéticos (Figura 4) poseen las propiedades de la osteointegración y la osteoconducción. El sustituto óseo sintético ideal tiene que cumplir con los siguientes requisitos:

- ❖ Ser biocompatible. La biocompatibilidad es la tolerancia biológica local de cualquier biomaterial, caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes.
- ❖ Una reacción fibrosa mínima.
- ❖ Una fuerza mecánica similar a la del hueso sustituido (compacto o esponjoso).
- ❖ Un modulo elástico similar al del hueso sustituido, lo que minimiza la acumulación de estrés en la interfase entre el material y el hueso previniendo la fractura por fatiga asociada a la carga cíclica.

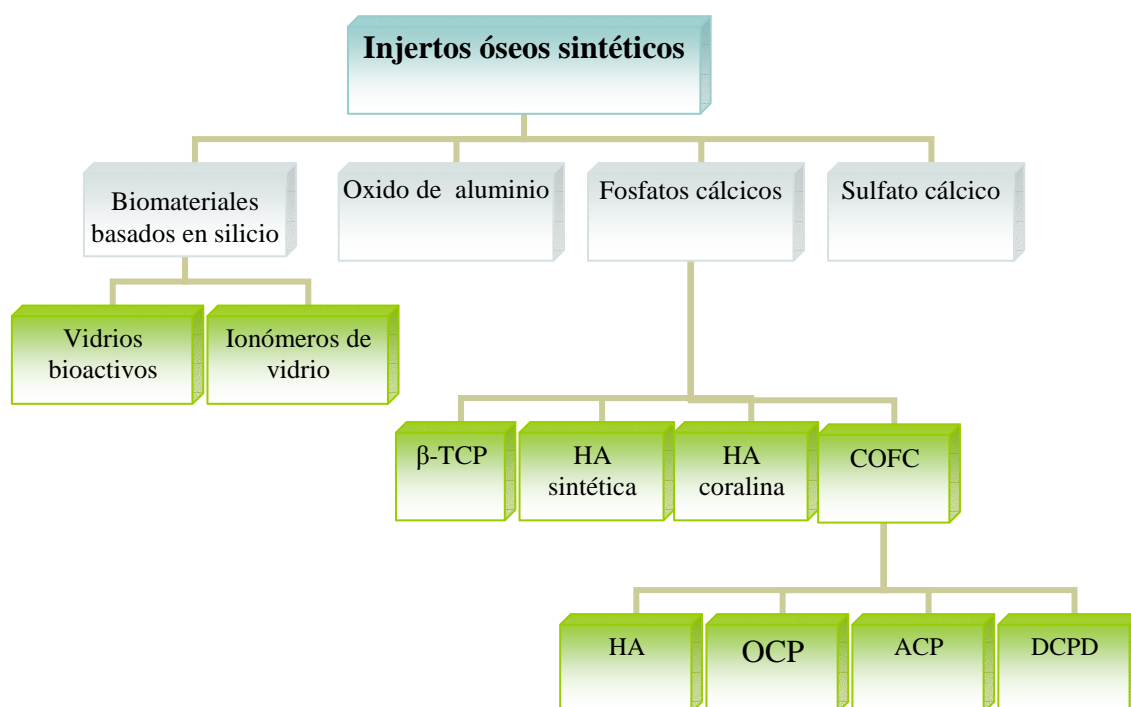


Figura 4. Diagrama orientativo de los injertos óseos sintéticos estudiados en este apartado.

Biomateriales basados en silicio

Los compuestos basados en silicio y capaces de unirse directamente al hueso se clasifican en dos familias: los vidrios bioactivos y los ionómeros de vidrio.

Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos fueron descritos en los años 1970 y están compuestos de óxido de sodio, óxido de calcio, pentóxido de fósforo y dióxido de silicio. El dióxido de silicio es el componente principal. El vidrio bioactivo es un material duro, no poroso y su solubilidad *in vivo* esta relacionada proporcionalmente con el contenido del óxido de sodio [57]. Biológicamente, el vidrio bioactivo posee las propiedades de osteointegración y osteoconducción. Al contactar con un medio acuoso fisiológico, se forma una capa de gel de sílice en la superficie del vidrio bioactivo. Los iones de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) presentes en el gel se precipitan en cristales de hidroxiapatita (similares a los del hueso) formando un enlace químico y fuerte con el hueso [57]. La

fuerza mecánica del vidrio bioactivo es superior a la de los fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita cerámica. Aunque el material se puede perforar y moldear, estos procesos conllevan el riesgo de su ruptura [45].

Clínicamente, el vidrio bioactivo se ha utilizado para aumentar el volumen del injerto autógeno y como sustituto óseo en la cirugía maxilofacial. Su uso en forma granulada como relleno óseo en zonas sin carga mecánica, no ha resultado superior al uso de otros materiales de relleno óseo. Sin embargo, las partículas del vidrio bioactivo se reabsorben más rápido que las de HA lo que supone una reconstrucción más rápida del defecto óseo. El material se utiliza también en la sustitución de la cadena osicular del oído medio y el recubrimiento de implantes metálicos para mejorar su osteointegración.

Las cerámicas bioactivas son una variación de los vidrios bioactivos que poseen propiedades mecánicas superiores a las de los vidrios bioactivos. Sin embargo, estos materiales son relativamente frágiles y propensos a romperse cuando se someten a carga cíclica. Las cerámicas bioactivas se han utilizado como prótesis vertebral en el tratamiento de tumores y fracturas por estallido de las vértebras y como implante orbitario [58 y 59].

Se han empleado dos métodos para mejorar la tenacidad de fractura de los vidrios y cerámicas bioactivas: la incorporación de fibras de acero inoxidable en biovidrios que ha aumentado su resistencia a flexión de 42 MPa a 340 MPa y la incorporación de partículas cerámicas de zirconio en cerámicas bioactivas que ha aumentado su resistencia a flexión de 680 MPa a 703 MPa y la tenacidad de 2.0 a 4.0 [60]. Con estas mejoras el módulo elástico de estos materiales es más alto que el hueso compacto.

Los composites de vidrio bioactivo están teniendo interés por sus propiedades elásticas. El mas favorable es la combinación del vidrio bioactivo con polimero de polisulfono. Dicha combinación ha resultado en un material bioactivo con propiedades mecánicas parecidas al hueso compacto y que se está ensayando como prótesis de cuerpo vertebral.

Ionómeros de vidrio

En 1970, los cementos de ionómeros de vidrio se empezaron a usar en odontología gracias a su capacidad de unión con el esmalte dental en ambiente húmedo. Su fase sólida consta de polvo de vidrio de calcio/aluminio/silicato de flúor (0.001-0.1 mm de

diámetro) mientras que la fase líquida del cemento es ácido policarboxílico. La mezcla de estas dos fases resulta en una reacción exotérmica ($\leq 56\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la liberación de CO_2 [61] que produce porosidad en la pasta del cemento. Este cemento fragua en 5 minutos y durante el proceso de fraguado la pasta del cemento tiene que ser protegida de los líquidos fisiológicos. Una vez fraguado el material es insoluble en agua y tiene una fuerza de compresión entre 180-220 MPa y un módulo elástico comparable con el del hueso compacto [62].

Biológicamente, el cemento es biocompatible y el mecanismo de su osteointegración es similar al del vidrio bioactivo. La porosidad del material le hace osteoconductor favoreciendo el crecimiento óseo. Sin embargo, el material no es biodegradable y no se sustituye por hueso.

Clínicamente, el cemento de ionómero de vidrio se usa en odontología para cementación, y como material restaurativo y base de alta resistencia. El cemento se usa también en la reconstrucción osicular y cirugías de seno en otorrinolaringología. También, se ha usado para cerrar imperfecciones en el cráneo y en la cirugía reconstructiva maxilofacial [45]. Sin embargo, su uso en contacto con el tejido nervioso y el fluido cerebroespinal es contraindicado debido a la liberación neurotóxica de iones de aluminio y del políácido residual. El cemento ionómero constituye una alternativa al cemento óseo de polimetilmetacrilato debido a su polimerización significativamente exotérmica ($78\text{-}120\text{ }^{\circ}\text{C}$) [63]. El ionómero de vidrio se puede utilizar para la liberación lenta de antibióticos y proteínas de alto peso molecular. Los ionómeros de vidrio son más eficientes que el PMMA en la liberación de proteínas y suponen menos riesgo para las proteínas térmicamente vulnerables [64].

Óxido de aluminio

El óxido de aluminio forma una parte de los biomateriales bioactivos y en sí mismo puede servir como sustituto óseo. Las cerámicas de alumina no se osteointegran por la falta de intercambio iónico con el hueso. Sin embargo, la aplicación de carga mecánica produce el contacto íntimo de la cerámica con el hueso y su estabilidad mecánica. Las cerámicas de alumina son muy rígidas, duras y más resistentes a la flexión que las cerámicas de HA. Se han utilizado para aumentar el volumen del injerto óseo y osteotomías en cuña. La falta de osteointegración limita su uso en cirugía ortopédica.

Se han usado en implantes orbitarios, reemplazamiento osicular y como forro para prótesis articular [45].

Sulfato cálcico

El sulfato cálcico se conoce como yeso y esta documentada su utilización por los árabes en el siglo décimo en el tratamiento de fractura en las extremidades. En 1852, Mathysen, un cirujano danés, incorporó el yeso en las vendas y en 1892 un alemán que se llamaba Dreesman ha tratado con éxito osteomielitis tuberculosa en huesos largos utilizando yeso fraguado con una solución de 5% fenol [65].

Se cree que el sulfato cálcico actúa como matriz osteoconductora para el crecimiento vascular y de células fibrogénicas y osteogénicas. Se reabsorbe el sulfato cálcico en 5-7 semanas *in vivo* mediante un proceso de disolución [66]. Debido a esta reabsorción rápida, el uso de sulfato cálcico impregnado con antibiótico es ventajoso en el tratamiento de osteomielitis evitando la necesidad de una segunda cirugía para quitar el material. Osteoset (Wright medical technology, Arlington, TN, USA) es un producto comercial de sulfato cálcico impregnado con tobramicina.

A pesar de que el sulfato cálcico fraguado posee una fuerza de compresión más alta que la del hueso esponjoso y una fuerza de tensión cerca a la del hueso esponjoso, el sulfato cálcico se ablanda y fragmenta en medio húmedo. Así, su uso debe ser limitado como relleno óseo en defectos óseos contenidos.

Fosfatos cálcicos

La familia de fosfatos cálcicos, como sustitutos óseos, posee las propiedades de osteointegración y osteoconducción. La osteointegración se debe a la precipitación de iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} derivados del material y el hueso, y la formación de una capa de apatita. Sin embargo, el uso de fosfatos cálcicos no aumenta la concentración de iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el suero. Los fosfatos cálcicos como sustitutos óseos tienen una excelente biocompatibilidad y no se ha reportado toxicidad sistémica ni reacciones inmunológicas contra cuerpo ajeno [67].

Fosfato tricálcico beta

El fosfato tricálcico beta (β -TCP) es uno de los primeros compuestos de fosfato cálcico utilizados como sustitutos óseos. En 1920, Albee y Morsion reportaron que la inyección de β -TCP aceleró la unión ósea en fractura ósea segmental [68]. El β -TCP esta disponible en formas porosas y sólidas, y también como granulado y bloques. El β -TCP poroso tiene fuerza de compresión y de tensión similares a las del hueso esponjoso. Sin embargo, el β -TCP es débil a las fuerzas de tensión y cizalla pero es más resistente a la fuerza de compresión [69]. El uso típico del β -TCP es en forma de gránulos porosos que migran menos que los gránulos sólidos debido a su fijación por el crecimiento del tejido fibrovascular [70]. La reabsorción del β -TCP *in vivo* ocurre vía la disolución y fragmentación durante 6 a 18 meses. Sin embargo, la cantidad de nuevo hueso formado es menor que la cantidad del β -TCP reabsorbido [71]. El uso clínico del β -TCP ha sido complementario a otros sustitos óseos menos reabsorbibles o para aumentar el volumen del injerto óseo autólogo.

Hidroxiapatita sintética

La hidroxiapatita constituye el mineral principal del hueso. La hidroxiapatita puede ser cerámica o no cerámica y ambos tipos vienen en formas porosas y sólidas, y en bloque o granulado. El hecho de ser cerámica se refiere a que los cristales de hidroxiapatita se han sometido a tratamiento térmico entre 700-1300 °C para formar una estructura altamente cristalina. La HA cerámica resiste la reabsorción *in vivo* (1-2% por año) [45]. Sin embargo, la HA no cerámica es relativamente mas reabsorbible *in vivo* y se puede prepara mediante una reacción de fraguado de un cemento de fosfato cálcico.

La hidroxiapatita sintética tiene buena fuerza de compresión pero es débil en tensión y cizallamiento. Cabe mencionar que la hidroxiapatita sintética en bloque sólido es difícil darle forma, no permite el crecimiento fibro-óseo dentro del material y tiene un modulo elástico más alto que el hueso [72 y 73]. Se ha utilizado con éxito en cubrir implantes metálicos para mejorar su osteointegración [73]. La forma porosa y granulada se utiliza solo o en combinación con hueso para rellenar defectos óseos.

El fosfato cálcico bifásico (BCP) está compuesto por HA y β -TCP en proporción variable y resulta de mezclas de fosfatos cálcicos con una relación Ca/P entre 1.5-1.67 calentadas a temperaturas superiores a 900 °C.

Hidroxiapatita coralina

ProOsteon (Interpore Internacional, Irving, CA, USA) es el nombre comercial de la hidroxiapatita coralina desarrollada en 1971 para obtener un implante de HA con tamaño de poro consistente y mejor interconectividad.

La preparación de HA porosa se basaba en la adición de peróxido de hidrógeno o partículas de naftaleno al material base anteriormente a su compactación y posterior calcinación. La formación de burbujas por peróxido de hidrógeno y la sublimación del naftaleno dan lugar a estructuras porosas. Sin embargo, con este método era muy difícil el control de tamaño de los poros y la interconectividad entre dichos poros. Ambas características son fundamentales para el funcionamiento *in vivo* del implante poroso ya que la falta de interconectividad deprime el crecimiento del tejido de soporte vascular y la isquemia de las células puede contribuir al fracaso del implante [74 y 75]. El tamaño de poro mínimo necesario para el crecimiento óseo en cerámicas porosas oscila entre 45-100 μm . El crecimiento fibrovascular se acelera si el tamaño de poro está entre 100 y 150 μm [76].

El coral marino de las especies porites y goniopora posee una estructura altamente regulada y permeable similar a la del hueso esponjoso. El carbonato cálcico del coral se trata para quitar la mayoría del material orgánico y luego se expone a presión y calor extremos en solución acuosa de fosfato para convertirlo en hidroxiapatita esterilizada.

Mecánicamente, la fuerza de compresión de la hidroxiapatita coralina es ligeramente mayor que la del hueso esponjoso. Sin embargo, el material es frágil y difícil para moldearlo. Su ventaja principal es la estructura porosa que permite el crecimiento completo del tejido fibro-óseo que rellena 50-80% de los poros en 3 meses [77]. Al completar el crecimiento del tejido fibro-óseo, el implante consiste aproximadamente de 17% hueso, 43% tejido blando y 40% de hidroxiapatita [78]. Por el contrario, la invasión ósea en otros sustitutos óseos cerámicos se limita a 2 mm aproximadamente de la superficie. La implantación de la hidroxiapatita coralina minimiza la concentración del

estrés en la interfase y permite el remodelado según la ley de Wolff: la formación de un gradiente en el que más hueso compacto se encuentra cerca de la superficie y más hueso trabecular cerca de la metáfisis. El crecimiento fibro-óseo dentro de la hidroxiapatita coralina mejora sus propiedades mecánicas y plásticas pero no alcanza la dureza del hueso trabecular. Dicha propiedad es deseable en defectos de metáfisis debido a que la hidroxiapatita coralina aporta un soporte estructural con distribución adecuada de la carga mecánica disminuyendo la posibilidad de acumulación de estrés en el cartílago articular suprayacente.

La hidroxiapatita coralina se ha utilizado con éxito en la regeneración ósea, cirugía maxilofacial y periodontal, y también en fracturas distales del radio. Además, el uso de hidroxiapatita coralina en defectos con carga mecánica como la metáfisis requiere una fijación interna hasta completar el crecimiento fibro-óseo debido a su inicial debilidad mecánica.

Cementos de fosfato cálcico

Las cerámicas de fosfato cálcicos (β -TCP y hidroxiapatita) han generado mucho interés para su uso en la restauración del tejido óseo [79], siendo la tasa de reabsorción de la HA más baja que la del β -TCP [80]. Sin embargo, la incapacidad de moldearle *in situ* (el quirófano) limita su uso a formas de bloque o granulado. El uso de la forma granulada supone el riesgo de migración de los gránulos lejos del defecto óseo por la falta de una integración mecánica [80].

En 1980s, Brown y Chow descubrieron e introdujeron la idea de un nuevo material de sustitución ósea, el cemento óseo de fosfato cálcico (COFC) [81]. El cemento de fosfato cálcico es un material compuesto por una fase sólida (polvo) y otra líquida que al ser mezcladas resultan en una masa plástica y moldeable que gradualmente endurece y se hace más resistente. El nuevo material añade a las ventajas de los fosfatos cálcicos, la moldeabilidad, la inyectabilidad y el relleno completo *in situ* del defecto óseo. Los cementos de fosfato cálcico se adaptan íntimamente al defecto óseo permitiendo la fabricación de formas y dimensiones difíciles de obtener por las cerámicas convencionales y se utilizan como portadores de sustancias fisiológicamente y farmacéuticamente activas. Además, el fraguado del cemento puede ofrecer una fuerza mecánica adecuada que permita la recuperación funcional del tejido en menos tiempo.

Otras ventajas se deben a la activación de las funciones de los osteoblastos y osteoclastos que van a sustituir el material gradualmente por un tejido óseo nuevo. La excelente biocompatibilidad de los cementos cálcicos permite su uso en amplio rango de aplicaciones quirúrgicas [79].

Aunque la idea de COFC es sencilla, las propiedades del COFC como los tiempos de fraguado, la fuerza de compresión, la porosidad, la solubilidad y la velocidad de reabsorción *in vivo* se ven afectadas con alto número de factores tecnológicos relacionados con la fabricación del COFC. Un control mejor de la microestructura y la química del polvo del cemento puede inducir mejoras en las propiedades iniciales de fraguado y las propiedades mecánicas finales del COFC. La incorporación de polímeros biodegradables en el COFC puede mejorar la reología y el manejo de la pasta del COFC, facilitando el desarrollo de técnicas quirúrgicas menos invasivas. La optimización de la reabsorción y la osteoconducción del COFC mediante modificaciones microestructurales (como la sustitución iónica) y la incorporación de factores de crecimiento puede acelerar el proceso de la regeneración ósea.

Los fosfatos cálcicos que pueden formar parte de la fase sólida de los cementos se clasifican en [82]:

- ❖ Fosfatos cálcicos que se obtienen mediante reacción en estado sólido

En la Tabla I se resumen las propiedades de los fosfatos cálcicos que pertenecen al sistema ternario de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ y se obtienen mediante reacción en estado sólido a altas temperaturas. Entre estos fosfatos cálcicos se incluyen el fosfato tricálcico- β (β -TCP), fosfato tricálcico- α (α -TCP), Hidroxiapatita cerámica (HA) y fosfato tetracálcico (TTCP). Se puede observar que el incremento de la relación Ca/P esta asociado a un incremento en la alcalinidad de la sal.

Tabla I. Producto de solubilidad, K_{ps} y razón molar Ca/P de algunos ortofosfatos cálcicos. [83]

Compuesto	Fórmula	Ca/P	$\log K_{ps}$ (25 °C)	$\log K_{ps}$ (37 °C)
Fosfato monocalcico monohidratado, MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	muy soluble	-
Fosfato monocalcico anhidro, MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	muy soluble	-
Brushita, fosfato dicalcico dihidratado, DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	6.59	6.63
Monetita, fosfato dicalcico anhidro, DCPA	CaHPO_4	1	6.90	7.02
Fosfato octacalcico, OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	96.6	95.9
fosfato tricalcico- α , α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	25.5	25.5
fosfato tricalcico- β , β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	28.9	29.5
Hidroxiapatita, HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	58.4	58.6
Fosfato tetracalcico, TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2	38 a 44	42.4

- ❖ Fosfatos cálcicos que se obtienen por precipitación a temperatura ambiente o corporal

En el sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$, un numero limitado de fosfatos cálcicos se pueden preparar vía la precipitación de una fase sólida cristalina con una estequiometría, propiedades físicas y termodinámicas bien definidas [82]. Generalmente, el interés del campo biomédico se enfoca en el fosfato monocalcico monohidratado (MCPM), el fosfato monocalcico anhidro (MCPA), el fosfato dicalcico dihidratado (DCPD), el fosfato octacalcico (OCP) y la hidroxiapatita precipitada (PHA). Los productos de solubilidad de estos compuestos están bien definidos (Tabla I). Los rangos pH de estabilidad de estos compuestos figuran en la Tabla II.

Dichos fosfatos cálcicos formarán el producto final de la reacción de fraguado de COFC diseñados para su uso a temperatura corporal (37°C). Cabe mencionar que el fosfato dicálcico anhidro (DCPA) es raramente preparado mediante la precipitación de una solución acuosa a temperatura ambiente [82]. Normalmente, el DCPA se prepara mediante la deshidratación de DCPD a temperatura entre 120-170 °C. La hidratación del DCPA es eficiente a temperaturas más altas que 50 °C [80].

Tabla II. Rango de pH de estabilidad para fosfatos cálcicos preparados a temperatura ambiente [79].

Compuesto	Rango pH de estabilidad
MCPM	0.0-2.0
DCPD	2.0-6.0
OCP	5.5-7.0
CDHA	6.5-9.5
PHA	9.5-12

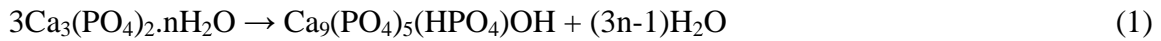
Se ha demostrado que la primera fase sólida y cristalina que se precipita en una solución ligeramente ácida o neutra supersaturada con respecto a fosfato cálcico tiene la estequiometría de $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$. Este compuesto posee propiedades físicas y termodinámicas bien definidas y se conoce como hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA). Aunque la constante de solubilidad de la CDHA no está exactamente definido, unas estimaciones le dan el valor de $\log(K_{ps}) = -85.1$ [82]. Así, no se puede sacar conclusiones precisas sobre su comportamiento termodinámico con respecto a otro fosfato cálcico. Se ha observado también que antes de la precipitación de la CDHA, se forma otro precipitado amorfo. Dicho precipitado se conoce como fosfato cálcico amorfo (ACP) [84].

Propiedades químico- físicas de la reacción de fraguado de COFC

Los COFC se producen mediante dos tipos de reacción de fraguado. El primero es la reacción de fraguado que ocurre de acuerdo con una reacción ácido-base; una fase de fosfato cálcico relativamente ácida reacciona con otra fase de fosfato cálcico relativamente alcalina produciendo una fase de fosfato cálcico relativamente neutra. Un típico ejemplo puede ser el cemento de Brown y Chow donde el TTCP reacciona con

DCPA produciendo PHA (ligeramente alcalino) [81]. Otro ejemplo es el cemento de Lemaitre donde el β -TCP reacciona con MCPM dando lugar a DCPD [85].

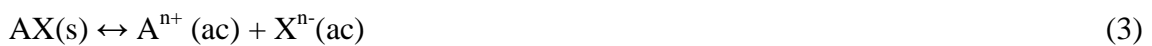
El segundo tipo de la reacción de fraguado es cuando el fosfato cálcico inicial y el producto final de la reacción de fraguado comparten la misma relación molar Ca/P [86]. Los ejemplos típicos son ACP y α -TCP que en la presencia de una solución acuosa dan lugar a PHA.



A continuación, se proceda a revisar unos conceptos químicos y físicos de las soluciones de fosfatos cálcicos que nos permiten entender y predecir las reacciones de fraguado que dan lugar a distintos tipos de COFC.

- Diagrama de solubilidad de los fosfatos cálcicos [79]

La precipitación de un mineral en solución acuosa ocurre cuando la solución es supersaturada con respecto a dicho mineral y su disolución ocurre cuando la solución acuosa es subsaturada con respecto al mineral. Así, las fuerzas que controlan las reacciones de disolución y precipitación de un mineral están relacionadas con la supersaturación y la subsaturación de la solución. Ambas son definidas por el producto de la solubilidad termodinámica que describe el equilibrio entre la fase sólida y la fase acuosa en una solución. La reacción que controla este equilibrio para un solo compuesto AX es:



dónde (s): sólido y (ac): acuoso.

Y en estado de equilibrio:

$$\Delta G/RT = \ln I_p^{\text{AX}} / \ln K_p^{\text{AX}} = \ln S \quad (4)$$

dónde ΔG : la energía libre; R : la constante de los gases; T : la temperatura absoluta; I_p^{AX} : el producto de la actividad iónica del compuesto AX; K_p^{AX} : el producto termodinámico

de la solubilidad o el producto de la solubilidad del compuesto AX; y S: el nivel termodinámico de la saturación.

Cuando $S = 1$ la solución acuosa está saturada con respecto al compuesto AX. Cuando $S < 1$ la solución acuosa es subsaturada y $\Delta G < 0$. En este caso, la reacción 3 tiende a ir hacia la derecha y el compuesto sólido se va a disolver. Cuando $S > 1$ la solución acuosa es supersaturada y $\Delta G > 0$. En este caso, la reacción 3 tiende a ir hacia la izquierda y la precipitación o el crecimiento del compuesto AX va a ocurrir.

La solubilidad de un compuesto mineral (AX) en solución acuosa del sistema $A(OH)_n$ - H_nX - H_2O se puede adecuadamente describir mediante el análisis de las concentraciones de los iones A^{n+} y X^{x-} . Sin embargo, en el caso de una base $A(OH)_n$ y un ácido débil H_nX es importante el uso del pH como tercera variable para la descripción completa de la solubilidad del compuesto AX. El diagrama que describe la relación entre estas variables se conoce como diagrama de la solubilidad. La figura 5 muestra un diagrama de solubilidad del compuesto AX donde se representa el logaritmo de la concentración de A en función del pH de la solución.

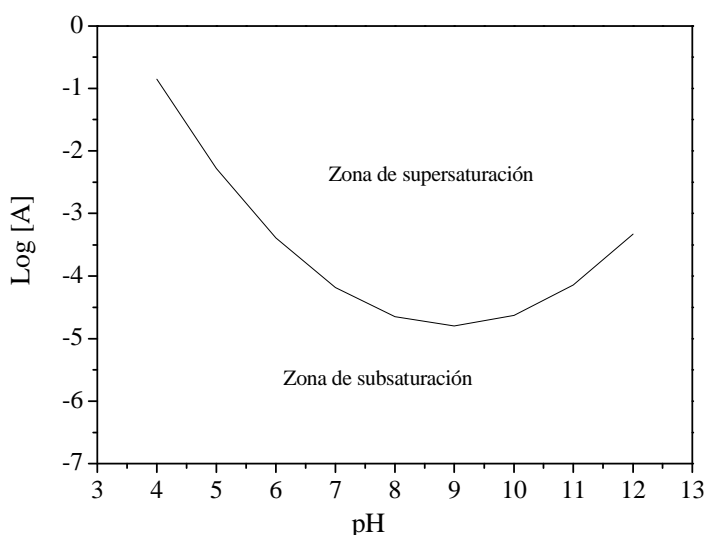


Figura 5. Diagrama de solubilidad de un compuesto mineral AX a una relación molar A/X definida en el sistema $A(OH)_n$ - H_nX - H_2O , donde H_nX es un ácido débil.

La línea en la figura 5 se llama la línea de saturación o la isoterma de solubilidad y representa el estado de equilibrio de la solución. Esta línea define la zona de subsaturación (la zona que está por debajo de la línea) y la zona de supersaturación que está por encima de la línea (Figura 5). El punto singular es la intersección de dos isotermas y predice el comportamiento termodinámico de varios compuesto en una solución (Figura 6). Si dos compuestos están en exceso en una solución más ácida (P_1) que el punto singular (P_3), el compuesto se va a disolver y el compuesto más ácido se va a precipitar. Este comportamiento se debe a que la solución es supersaturada con respecto al compuesto más ácido. Este proceso de disolución-precipitación se continúa hasta que el pH y la composición lleguen al punto singular, dónde los dos compuestos se encuentran en equilibrio con la solución y ninguno se va a precipitar. La conclusión es similar cuando los dos compuestos están en exceso en una solución más básica (P_2) que el punto singular (P_3). En dicho caso, el compuesto mas ácido va a disolverse y el compuesto mas alcalino se va a precipitar debido a que la solución esta supersaturado con respecto al compuesto más alcalino. El efecto del punto singular en los diagramas de solubilidad se denomina como el efecto atractivo de los puntos singulares [87].

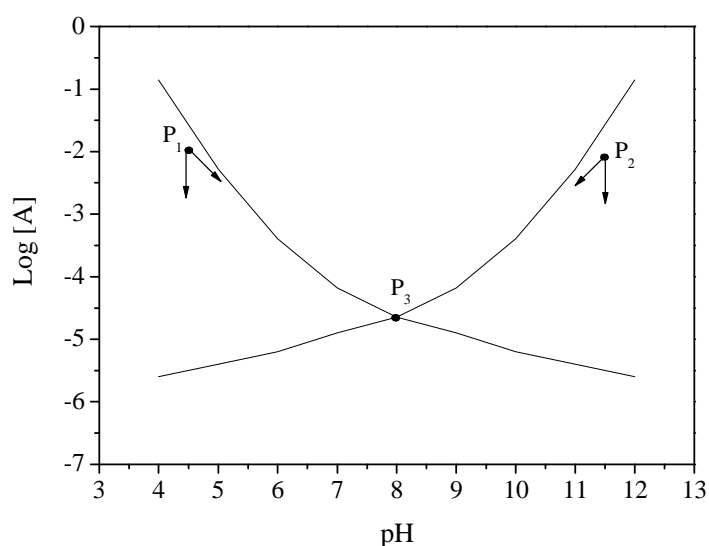


Figura 6. La posición relativa de dos isotermas para dos compuestos hipotéticos en el sistema $\text{A(OH)}_n\text{-H}_n\text{X-H}_2\text{O}$ a una relación molar A/X definida.

Sin embargo, cuando se representan en el mismo diagrama de solubilidad los isotermas de compuestos minerales obtenidos a temperatura ambiente junto con los isotermas de compuestos minerales obtenidos a altas temperaturas, se deben sacar cuidadosamente las conclusiones sobre el efecto atractivo del punto singular y los procesos de disolución-precipitación [88]. En el caso de COFC, la reacción de fraguado de una mezcla de dos fosfatos cálcicos con una solución acuosa solo puede dar lugar a las fases minerales que se forman a temperatura ambiente o corporal. Estas fases son Hidroxiapatita precipitada (PHA), hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA), fosfato octacálcico (OCP) y fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) mientras no es posible obtener fosfato tetracálcico (TTCP), fosfato tricálcico α (α -TCP), fosfato tricálcico β (β -TCP) ni fosfato dicálcico anhidro (DCPA) como producto intermedio de cualquier reacción de fraguado.

Es también importante saber que isotermas como las de la figura 6 son solo válidas para un rango de relaciones molares de A/X. El pH del punto singular puede desplazarse ligeramente con cambios en el ratio de A/X de la solución. En este sentido, el punto singular se denomina punto quasi-singular.

La figura 7 muestra los diagramas de solubilidad del sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37 °C dónde las isotermas de solubilidad representan el logaritmo de la concentración del ión de calcio de las soluciones saturadas en función del pH. Mientras que la figura 8 representa las isotermas de la solubilidad en función del logaritmo de las concentraciones del fósforo. Las sales de fosfatos cálcicos representadas son TTCP, DCPD, DCPA, OCP, α -TCP, β -TCP y HA.

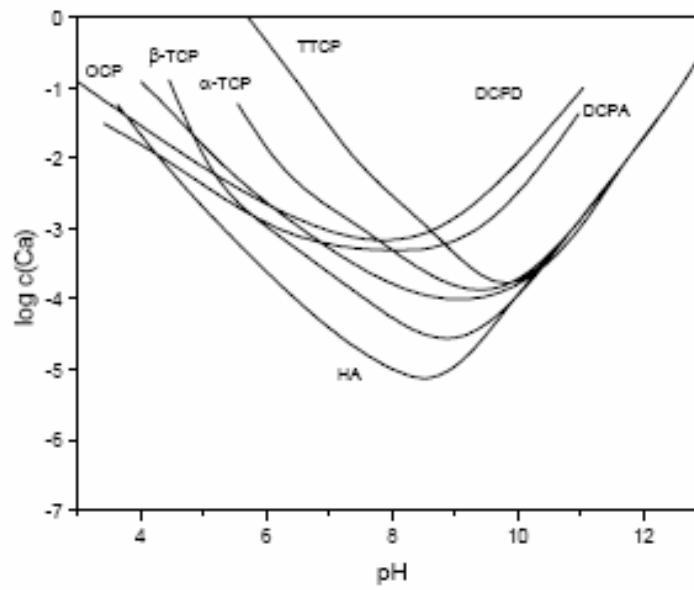


Figura 7. Isotermas de solubilidad de fosfatos cálcicos en equilibrio con sus soluciones del sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C [79].

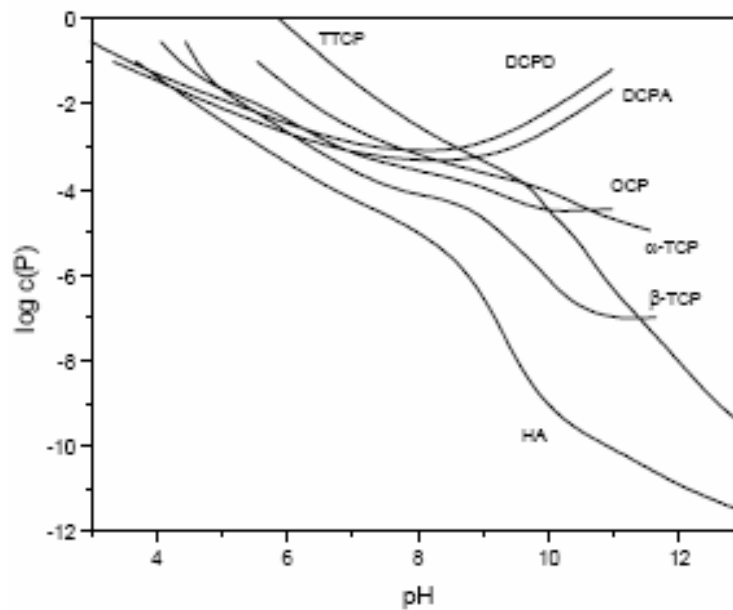


Figura 8. Isotermas de solubilidad de fosfatos cálcicos en equilibrio con sus soluciones del sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C [79].

En las figuras 7 y 8, las pendientes de las isotermas en diagramas de solubilidad poseen valores negativos en regiones neutras y ácidas ($\text{pH} < 7$). El valor negativo indica que

estos compuestos son más solubles a pH más ácido. El gradiente de la pendiente da una idea sobre el incremento de la solubilidad de una sal a pH mas bajo. En este sentido, la pendiente de la isoterma se puede considerar como una medida de la alcalinidad de la sal debido a que la solubilidad de una sal alcalina es más alta que la de una sal ácida para la misma caída en el pH. De acuerdo con este criterio, DCPD y DCPA son sales ácidas en comparación con OCP, α -TCP, β -TCP, HA y TTCP.

En zonas alcalinas de los diagramas de solubilidad, la concentración de calcio aumenta a pH más alto (Figura 7) mientras que la concentración del fósforo disminuye, con la excepción de las isotermas de solubilidad de DCPD y DCPA. La razón de este comportamiento de las isotermas en la figura 7 se relaciona con la alcalinidad y la relación Ca/P de los compuestos.

Las figuras 7 y 8 nos dan idea sobre la estabilidad relativa de las distintas sales a valores diferentes de pH. Generalmente, para un valor determinado de pH la sal mas estable y menos soluble es la sal cuyo isoterma de solubilidad cae debajo de la isoterma de otra sal. De acuerdo con esta regla, a 37 °C, HA es la sal menos soluble y mas estable a $\text{pH} \geq 4$, TTCP es la sal mas soluble a $\text{pH} < 8.5$ y DCPD es la mas soluble a $\text{pH} > 8.5$.

Se puede señalar que las fuerzas que controlan las reacciones químicas que ocurren en un sistema de COFC se relacionan con la estabilidad relativa de las distintas sales de fosfatos cálcicos. Así, los factores que cambian los diagramas de solubilidad de los fosfatos cálcicos influyen en su reactividad y estabilidad relativa.

- Efecto de la relación Ca/P de una solución en las isotermas de solubilidad

Para estudiar el efecto de la relación Ca/P de una solución en las isotermas de solubilidad, debe analizarse el comportamiento de las isotermas en sistemas más complejos como por ejemplo el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-MX-H}_2\text{O}$. Dónde MX es un electrolito añadido al sistema para satisfacer la electroneutralidad y los iones M^+ y X^- no afectan las fases sólidas ni forman complejos con los distintos especies de calcio y fosfato [89]. Se ha realizado el estudio del efecto de la relación Ca/P de la solución en las isotermas de la solubilidad de la HA, DCPA y calcita (CaCO_3) en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ (Figura 9). Los resultados muestran que:

- ❖ El incremento de la relación Ca/P de la solución requiere más cantidad del HNO_3 para ajustar el pH del sistema. Esto resulta en la disolución de más iones de calcio del fosfato cálcico para neutralizar las cargas negativas aportadas por los iones NO_3^- y la disminución de la disolución de iones de fosfato para satisfacer la condición del producto de solubilidad del fosfato cálcico [79 y 90].

De la misma manera, una relación Ca/P menor incrementa la concentración de los iones de K^+ . Lo que aumenta la concentración del ión de fosfato (HPO_4^{2-}) para mantener la electroneutralidad de la solución a la vez que se disminuye la concentración del ión de calcio para satisfacer el producto de solubilidad de la sal en cuestión.

- ❖ En la figura 9, se puede observar que cuando es menor la diferencia en la relación Ca/P entre la solución y el fosfato cálcico, menor es la cantidad de dicha sal necesaria para saturar una unidad de volumen de la solución. Este efecto se denomina el efecto del ión común [79] que es importante para diseñar el uso de aditivos como retardantes o aceleradores de la reacción de fraguado que pueden actuar como iones comunes [91].
- ❖ La solubilidad del CaCO_3 aumenta al disminuir la relación Ca/P, debido a la formación de complejos de fosfato cálcico.

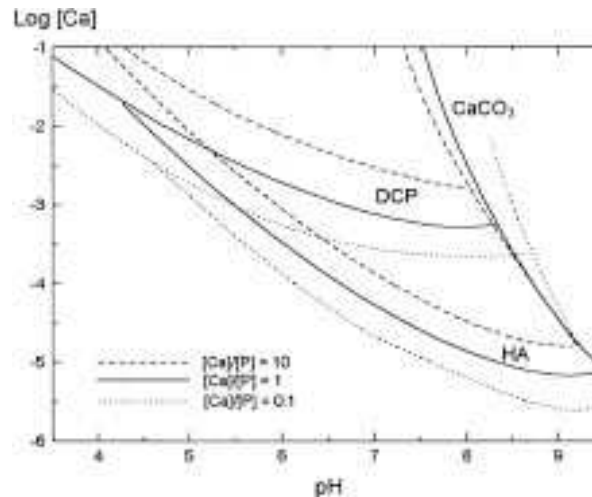


Figura 9. Efecto de la relación Ca/P en las isotermas de la solubilidad de HA y DCPA ($p(\text{CO}_2) = 1.013 \times 10^{-25}$ Pa) y en la isoterma de la solubilidad de CaCO_3 ($p(\text{CO}_2) = 1.013 \times 10^{-1.48}$ Pa) en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ a una temperatura de 25 °C [79].

- Efecto de la temperatura

La figura 10 muestra el efecto de la temperatura en las isotermas de solubilidad de la HA, DCPA y CaCO_3 . Generalmente, la solubilidad del fosfato cálcico disminuye al subir la temperatura y este efecto es mas pronunciado a pH bajo. El aumento de la temperatura del sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ resulta en la migración del punto singular de las isotermas de la HA y el DCPA a pH más bajo y la solubilidad de la HA es mas sensible al cambio en la temperatura que la DCPA. El efecto de la temperatura en las isotermas de solubilidad y los puntos singulares no es importante en el rango $25 < T < 37^\circ\text{C}$. Así, las isotermas de solubilidad a 25 °C pueden ser consideradas para predecir el comportamiento termodinámico de COFC cuando las isotermas a 37 °C no están disponibles.

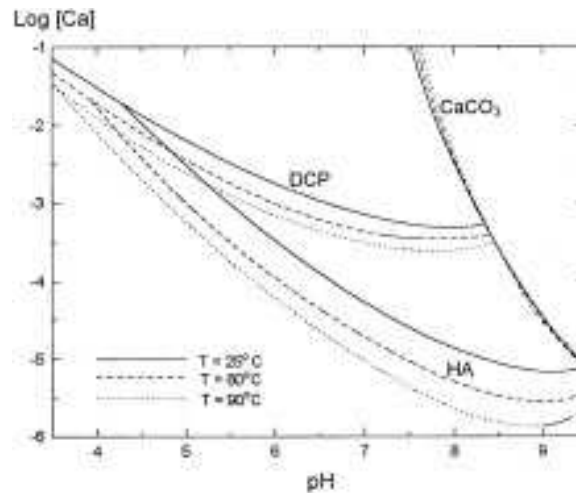


Figura 10. Efecto de la temperatura en los isotermas de la solubilidad de HA y DCPA (CO_2 $p(\text{CO}_2) = 1.0136 \times 10^{-25}$ Pa) y en la isoterma de la solubilidad de CaCO_3 ($p(\text{CO}_2) = 1.0136 \times 10^{-1.48}$ Pa) en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ ($\text{Ca/P} = 1$) [79].

El efecto de $p(\text{CO}_2)$ en los puntos singulares de los fosfatos cálcicos es mínimo y en este sentido se puede ignorar [84]. La Tabla III resume todos los puntos singulares que ocurren en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37 °C. Las diferencias entre los pH de equilibrio de TTCP correspondientes a distintos $p(\text{CO}_2)$, se deben a la variación en la constante del producto de solubilidad.

Tabla III. Puntos singulares entre fosfatos cálcicos en el sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a $p(\text{CO}_2) = 1.013 \times 10^{-25} \text{ Pa}$ y $p(\text{CO}_2) = 1.66 \text{ MPa}$ (temperatura 37°C) [79].

Emparejamiento	La descripción química	pH ($p = 1.0136 \times 10^{-25} \text{ Pa}$)	pH ($p = 1.66 \text{ MPa}$)
TTCP-MCPM	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O- Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	6.5	5.3
TTCP-DCPD	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O- CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.5	6.5
TTCP-DCPA	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O- CaHPO}_4$	8.8	6.8
TTCP- α -TCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O- } \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9.5	*
TTCP-OCF	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O- Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10.0	*
TTCP- β -TCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O- } \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	11.3	*
α -TCP-MCPM	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{- Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	5.5	5.5
α -TCP-DCPD	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{- CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.8	*
α -TCP-DCPA	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{- CaHPO}_4$	8.2	*
β -TCP-MCPM	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{- Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	4.4	4.4
β -TCP-DCPD	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{- CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.4	5.7
β -TCP-DCPA	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{- CaHPO}_4$	6.0	6.0
OCF- β -TCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O- } \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	4.7	4.7
OCF-DCPD	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O- CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.2	6.2
OCF-DCPA	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\cdot 5\text{H}_2\text{O- CaHPO}_4$	6.9	*
HA-MCPM	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{- Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	3.5	3.3
HA-DCPD	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{- CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.8	3.1
HA-DCPA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{- CaHPO}_4$	4.3	4.3
MCPM-DCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O- CaHPO}_4$	2.7	2.7
MCPM-DCPD	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O- CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.2	3.5

(*) = no se ha encontrado en la literatura consultada.

Los datos termodinámicos de los fosfatos cálcicos en condiciones fisiológicas ($T = 37^\circ\text{C}$ y $p(\text{CO}_2) = 1.66 \text{ MPa}$) nos permiten predecir el comportamiento *in vivo* de los fosfatos cálcicos durante los primeros momentos de la reacción de fraguado de COFC. Sin embargo, el comportamiento *in vivo* del COFC en contacto con los fluidos corporales

no se puede predecir a largo plazo durante los procesos de endurecimiento y/o reabsorción. Hay estudios que relacionan la velocidad de reabsorción con la solubilidad relativa de los fosfatos cálcicos del cemento [92]. Así la Tabla III desvela las varias posibilidades de desarrollar COFC para aplicaciones clínicas, lo que implica un número creciente de patentes.

Regla de Ostwald

De acuerdo con la regla de Ostwald, en el caso de existir la posibilidad de una serie de transformaciones de fase de un estado menos estable, a estados cada vez más estables, generalmente se forma primero la más estable de las modificaciones cercanas pero no la más estable de todas.

Según esta regla, la primera fase que se forma en un proceso de precipitación será aquella de mayor solubilidad. Esa fase se transforma seguidamente por disolución y recristalización en las fases menos solubles. La fase finalmente obtenida será el compuesto menos soluble.

La consecuencia de esta regla, prevista teóricamente y confirmada experimentalmente para los fosfatos de calcio, es que para valores de pH superiores a 7, la primera fase a cristalizar es el ACP, que se convierte lentamente en hidroxiapatita. Para valores de pH entre 5 y 7 puede ocurrir también la formación de precursores como el OCP y el DCPD [93].

Manejo y propiedades mecánicas de los COFC

En este apartado vamos a discutir unos aspectos importantes de los cementos óseos de fosfatos cálcicos como el tiempo de fraguado, las propiedades mecánicas y la cohesión y después presentamos su sistema de clasificación y sus propiedades biológicas.

- Tiempo de fraguado

Una propiedad muy importante para su aplicación en odontología es el tiempo de fraguado del cemento. El método tradicional de determinar el tiempo de fraguado es el test de la aguja de Gillmore [13]. El cemento se considera fraguado cuando puede resistir una carga mecánica específica aplicada a su superficie. Este método da excelentes resultados cuando la carga aplicada es 10-20% de la fuerza de compresión máxima del COFC y cuando dicha fuerza de compresión aumenta continuamente

durante el proceso de fraguado. La reacción de fraguado de algunos sistemas de COFC ocurre en dos pasos y en esos casos propusieron medir el tiempo de fraguado inicial y el tiempo de fraguado final. [94]

Otro método para caracterizar el proceso de fraguado es la calorimetría diferencial de barrido (DSC) [95] que permite estudiar la cinética de la reacción de fraguado. Hofmann et al han mostrado que los tiempos de fraguado (inicial y final) están correlacionados con el flujo máximo de calor medido con el DSC. Las desventajas de este método para determinar el tiempo de fraguado son su complejidad y coste [96].

El tiempo de fraguado de COFC depende de [97]:

- ❖ El tamaño de las partículas del polvo del COFC: un tamaño de partículas menor tiende a reducir el tiempo de fraguado.
- ❖ La relación polvo líquido: una relación P/L mayor tiende a reducir el tiempo de fraguado de COFC.
- ❖ La adición de iones de calcio y/o fosfato que puedan estar rápidamente disponibles para la reacción de fraguado: estos iones pueden ser disueltos en la fase líquida de COFC o añadidos a la fase sólida en forma de una sal muy soluble. Cuanto mayor esta la concentración, menor es el tiempo de fraguado.
- ❖ La adición de un nucleante de cristalización. Un ejemplo es la adición de apatita nanocristalina a cementos de apatita; una concentración mayor de apatita nanocristalina supone un menor tiempo de fraguado.
- ❖ La adición de un inhibidor del crecimiento de los cristales: a mayor concentración del inhibidor, el tiempo de fraguado es mayor.
- ❖ La temperatura: a temperaturas más altas, el tiempo de fraguado es menor [91].

Desde el punto de vista clínico los tiempos de fraguado significan que la pasta de COFC debe ser implantada antes del tiempo de fraguado inicial y que la incisión se puede suturar después del tiempo de fraguado final. Entre estos dos tiempos, la manipulación de la pasta del cemento puede producir grietas en el cemento [13]. El contacto prematuro con un medio acuoso puede provocar la desintegración del COFC. Para ello, se ha introducido el tiempo de cohesión (CT) que se define como el tiempo mínimo necesario para obtener una pasta de cemento estable en una solución [13]. Clínicamente,

esto significa que la pasta del cemento se implanta después del CT pero antes del tiempo de fraguado inicial.

Recientemente, se han formulado los siguientes requerimientos para el manejo de COFC en clínica [13]:

- ❖ Tiempo de fraguado inicial (IST): $3 \leq \text{IST} < 8$ minutos.
- ❖ Tiempo de cohesión: $\text{IST}-\text{CT} \geq 1$ minuto.
- ❖ Tiempo de fraguado final (FST): $\text{FST} \leq 15$ minutos

El tiempo de fraguado inicial de COFC para aplicaciones dentales se aproxima a 3 minutos, mientras en aplicaciones ortopédicas se aproxima a 8 minutos. La mayoría de los cementos cálcicos fragua más rápido a temperatura corporal que a temperatura ambiente [91].

- Propiedades mecánicas de COFC

Los COFC son materiales frágiles. La fuerza de tensión es 5-20 veces menor que la fuerza de compresión. La mayoría de los COFC tienen una fuerza de tensión entre 1-10 MPa, mientras que la fuerza de compresión varía entre 10-100 MPa. Así, los COFC solo se pueden aplicar en zonas de carga mecánica baja o nula y en combinación con implantes metálicos. El comportamiento mecánico del cemento *in vivo* no solo depende de la fuerza de compresión sino también en las fuerzas de cizalla y de tensión [86].

En la mayoría de las aplicaciones clínicas, los COFC se aplican en contacto directo con el hueso esponjoso por lo que la fuerza del COFC debe ser igual a la máxima fuerza del hueso esponjoso. La fuerza de compresión del COFC será la más relevante para caracterizar las propiedades mecánicas ya que en la mayoría de las aplicaciones el cemento está encerrado en el hueso [13]. La fuerza de compresión máxima del hueso esponjoso humano es 10 MPa. Por lo tanto, el requerimiento principal de las propiedades mecánicas de COFC es una fuerza de compresión ≥ 10 MPa.

Estrategias que se pueden aplicar para mejorar las propiedades mecánicas de COFC:

- ❖ La porosidad de COFC: cuando mas denso el COFC, mas altas son sus propiedades mecánicas. Una relación alta de P/L y el uso de gránulos densos disminuyen la porosidad de COFC.
- ❖ La adición de fibras reforzantes
- ❖ Disminuir el tamaño medio del cristal: La inhibición de la reacción de fraguado disminuye el tamaño medio de los cristales en el COFC.

- Cohesión

La cohesión es la capacidad de un cemento de mantenerse como una sola pieza durante el proceso de fraguado [97]. La cohesión de los cementos cálcicos es una propiedad transitoria. Generalmente, la pasta del cemento con un tiempo de fraguado corto tiene mejor cohesión que una pasta de cemento con tiempo de fraguado más alto.

Los COFC pueden ser muy adecuados para vertebroplastia. Los cuerpos vertebrales son intensamente irrigados por sangre y la distancia entre la espina vertebral y los pulmones o el corazón es corta. Así, la importancia de la cohesión se ve destacada en que el uso de COFC en vertebroplastia se ha asociado con alto riesgo de coagulación sanguínea [98]. Además, se ha reportado que la aplicación endovascular de cantidades pequeñas de cemento de fosfato cálcico resultó en la oclusión del ventrículo derecho y embolias pulmonares masivas [99]. Los autores explican que las micropartículas del cemento actúan como andamio para la agregación de las plaquetas mientras que los iones de calcio liberados podrían potenciar la coagulación. Además, un estudio *in vitro* confirma la importancia de la cohesión al demostrar que las partículas de cemento menores de 10 μm de diámetro disminuyeron la viabilidad, la proliferación y la producción de la matriz extracelular de los osteoblastos [100]. Así, la desintegración del cemento de fosfato cálcico en contacto con medio acuoso puede requerir al profesional clínico mantener seco el campo quirúrgico [101] restringiendo su uso en zonas con alto suministro sanguíneo.

La cohesión del cemento no solo depende de las energías de interacción entre las partículas sino también depende de la interacción con el líquido en contacto con el cemento. Las interacciones con el líquido en contacto estan principalmente controladas

por la diferencia en la presión osmótica entre el líquido intersticial de la pasta del cemento y el líquido circundante [102].

La energía potencial de atracción disminuye y también la cohesión con el aumento del tamaño de las partículas. Los factores que aumentan la distancia entre partículas, como el aumento de la relación L/P o la presencia de cadenas de polímero adheridas a la superficie de las partículas, disminuyen la energía de la interacción van der Waals (atractiva). La adición de polímeros como los polisacáridos o polímeros carboxilados estabiliza estéricamente las partículas y disminuye la cohesión. La estabilización estérica es la adsorción de moléculas de polímero (iónico o no iónico) o surfactante (típicamente iónico) que impiden el acercamiento de las partículas [103]. La estabilización estérica ocurre cuando el polímero es físicamente o químicamente adherido a la superficie de la partícula. La estabilización por depleción ocurre cuando el polímero no está adherido a la partícula sino que está libre en la solución. La estabilización estérica no depende de la naturaleza de la partícula sino depende de las interacciones polímero-polímero y polímero-disolvente [102].

Todos los factores que disminuyen la carga superficial de las partículas o el espesor de la doble capa eléctrica aumentan la cohesión. Esto se puede conseguir de diferentes maneras: la carga superficial se puede reducir con el aumento del pH de la solución hacia el punto isoeléctrico de las partículas. El espesor de la doble capa eléctrica se puede reducir aumentando la fuerza iónica de la solución donde se encuentran las partículas. Sin embargo, la adsorción de moléculas cargadas eléctricamente, como los iones de citrato o ácido poliacrílico a la superficie de las partículas, disminuye la cohesión del cemento.

La presión osmótica entre la pasta del cemento y el líquido circundante depende de la diferencia en la concentración de iones y moléculas disueltas. Si la concentración total de los solutos es menor en el líquido intersticial de la pasta del cemento, el flujo de las moléculas de la solución hacia la pasta del cemento será más grande que la dirección contraria. Este flujo resulta en el hinchamiento de la pasta del cemento y la disminución de la cohesión. En el caso de una concentración alta de los solutos en la solución, la superficie del cemento tiende a perder el líquido intersticial aumentando la cohesión del cemento. Así, la cohesión del cemento tiende a ser mejor en suero (0.15 M) que en agua. Se ha reportado que la cantidad de las partículas liberadas del cemento fue 70

veces menor en tampón fosfato (PBS; 150 mM y pH 7.4) que en agua [97]. La presión osmótica afecta más la cohesión de la pasta del cemento más permeable. La permeabilidad de la pasta del cemento aumenta cuando el tamaño de las partículas y la relación L/P son mas altas.

Según lo anteriormente descrito, la adición de un polímero sin carga eléctrica en la fase líquida del cemento debe disminuir la cohesión debido al aumento de la presión osmótica y la estabilización estérica. Sin embargo, la adición de polisacáridos disueltos ha mejorado la cohesión del cemento [104]. Este punto refleja la complejidad del problema y apunta hacia la presencia de otros factores que juegan un papel importante en la cohesión. Por ejemplo, es difícil impedir las fuerzas que actúan en la superficie del cemento como las fuerzas debidas al flujo sanguíneo y fuerzas gravitatorias. El efecto de estas fuerzas en la cohesión del cemento debería disminuir con el aumento en la viscosidad de la pasta del cemento. Sin embargo, al incrementar la concentración del hialuronato sódico de 1.0 % a 1.5% en la fase líquida del COFC disminuyó drásticamente la cohesión del cemento. Se ha reportado que el movimiento browniano puede decomponer la superficie del cemento, particularmente cuando el tamaño de las partículas es pequeño.

- Clasificación de los COFCs

Se clasifican los cementos óseos de fosfatos cálcicos según el producto final de la reacción de fraguado en:

- ❖ Cementos de hidroxiapatita precipitada (PHA)

La química de la hidroxiapatita precipitada ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$) es compleja. La relación Ca/P de la PHA oscila entre 1.50-1.67 [105], sin embargo, se ha reportado que dicha relación puede estar fuera de este rango [106]. La PHA con una relación Ca/P de 1.5 es frecuentemente conocida como hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) o fosfato tricálcico. Este último nombre puede generar confusión con el β -TCP que tiene la misma relación Ca/P pero se diferencian en la estructura cristalina [86].

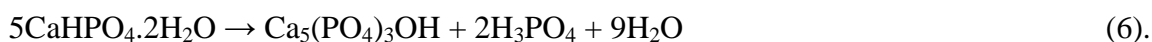
La PHA generalmente es poco cristalina y los cristales tienen dimensiones micrométricas. El área específica superficial de de PHA es muy grande, típicamente entre 25-100 mm^2/g . Así La PHA es muy similar a la apatita presente en el hueso. La

diferencia principal entre las dos fases es la ausencia de impurezas en la estructura de la PHA (principalmente, iones de carbonato y magnesio) [86]. La solubilidad de la PHA depende de la estequiometría, la cristalinidad y el tamaño del cristal. Dicha solubilidad aumente con la disminución de la relación Ca/P, la cristalinidad y el tamaño de cristal [86].

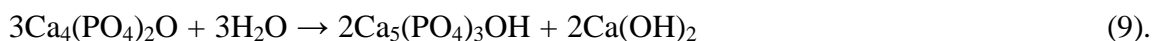
Se clasifican los cementos de PHA o CDHA según el número y el tipo de los fosfatos cálcicos que forman parte del cemento en tres grupos; el primero consta de los fosfatos cálcicos cuya hidrólisis produce PHA o CDHA, el segundo consta de dos fosfatos cálcicos, uno de ellos es TTCP y el tercero esta compuesto por dos fosfatos cálcicos con una relación Ca/P menor de 1.67 (la relación Ca/P estequiométrica de HA).

Hidrólisis de fosfatos cálcicos [79]

La PHA es la fase menos soluble en el rango de pH > 4.2 lo que implica que en una solución acuosa, cualquier otro fosfato cálcico en este rango de pH tiende a disolverse y precipitarse en PHA. Sin embargo, la termodinámica del sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ sin otro ácido o base, muestra que la formación de PHA por la hidrólisis de otro fosfato cálcico es cinéticamente muy lenta debido a la disminución de la supersaturación entre las isotermas del fosfato cálcico en cuestión y la PHA [79]. Con la excepción de TTCP, los fosfatos cálcicos en la Tabla I tienen una relación Ca/P menor que la de HA (1.76), esto significa que la hidrólisis de los fosfatos cálcicos a PHA libera ácido fosforico (H_3PO_4) (Reacciones 5-8). Dicha liberación bajará el pH de la solución disminuyendo adicionalmente el nivel de la supersaturación del fosfato cálcico con respecto a PHA debido al acercamiento al punto singular de solubilidad [79]. La hidrólisis para cuando se alcanza el punto singular.



La hidrólisis del TTCP libera $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a la solución aumentando su pH. Este aumento disminuye el nivel de supersaturación con respecto a PHA.



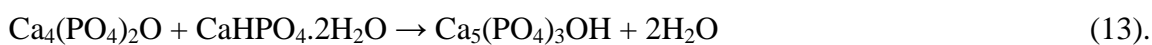
Así, estos sistemas no son adecuados para su uso en aplicaciones clínicas. La eliminación de los productos secundarios (H_3PO_4 y $\text{Ca}(\text{OH})_2$) es necesario para que la transformación a PHA sea completa. Sin embargo, el uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o NaOH para neutralizar H_3PO_4 supondría problemas de citotoxicidad y muerte celular debido a un pH inicial alto [85].

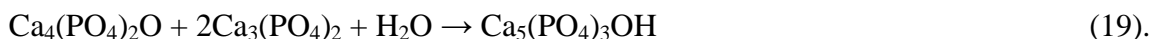
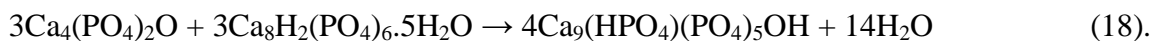
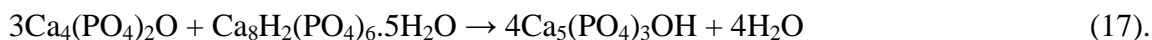
El único sistema de COFC de solo un fosfato cálcico se ha reportado por Monma et al [107]. Estos autores mostraron que la transformación del α -TCP a CDHA ocurre en soluciones con $\text{pH} \geq 7.5$. Sin embargo, según los autores, dicha transformación es muy lenta en el orden de 5% a 37 °C. Recientemente [108], se han realizado avances importantes en la mejora las propiedades de fraguado y la velocidad de la reacción de COFC basado en α -TCP.



Mezcla de TTCP y otro fosfato cálcico [79 y 82]

El fosfato tetracálcico es el único fosfato cálcico que tiene la relación Ca/P más alta que la HA. Así, el TTCP se puede mezclar con uno o más de los fosfatos cálcicos que tienen una relación Ca/P menor para obtener una mezcla de PHA o CDHA sin la formación de ácidos o bases como productos secundarios. Teóricamente, cualquier fosfato cálcico más ácido que la PHA puede reaccionar con TTCP para obtener PHA o CDHA siguiendo las reacciones:





Sin embargo, las combinaciones de TTCP + OCP, TTCP + α -TCP y TTCP + β -TCP tienen los puntos singulares de la solubilidad muy cerca de la isoterma de solubilidad de PHA. Así, dichas combinaciones tienen un nivel muy bajo de la supersaturación y la reacción de fraguado es muy lenta lo que significa que estas combinaciones no son adecuadas para el desarrollo de COFC [83].

En función de las propiedades de fraguado, sólo las combinaciones de TTCP + MCPM, TTCP + DCPD y TTCP + DCPA son adecuadas para la preparación del cemento de hidroxiapatita.

La formación de PHA o CDHA de la combinación TTCP + MCPM no ocurre en sólo un paso. La formación de DCPD como fase intermedia en la reacción (11) es cinéticamente más favorable [109]. Sin embargo, el producto final de la reacción será PHA o CDHA según la estequiometría del sistema inicial.

Las combinaciones TTCP + DCPD y TTCP + DCPA son las mas estudias. Estas combinaciones proporcionan un cemento que se fragua a temperatura ambiente o corporal en un rango de pH neutro.

Mezclas de fosfatos cálcicos con una relación Ca/P < 1.67 [79]

La PHA se obtiene como producto final de la reacción fraguado de unas mezclas de fosfatos cálcicos con relación Ca/P menor que 1.67 utilizando una fuente adicional de iones de calcio como CaCO_3 o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en el lugar de TTCP.

Uno de estos sistemas es la mezcla β -TCP + DCPD + CaCO_3 [110]. De acuerdo con estos estudios, los cristales de PHA se forman de la reacción inicial entre DCPD y

CaCO_3 . Estos cristales de PHA funcionan como uniones entre las partículas del β -TCP. Cuando el DCPD se habría consumido, la formación de PHA sería controlado por la reacción entre el β -TCP y CaCO_3 . Esta segunda reacción tiene un efecto determinante en las propiedades mecánicas del cemento.

Otro sistema que ha despertado gran interés debido a sus propiedades de fraguado y endurecimiento es el Norian SRSTM fabricado por La Corporación Norian. Este sistema es una mezcla de α -TCP + MCPM + CaCO_3 . El proceso inicial de fraguado forma DCPD mientras que el producto final de fraguado es “*dahlite*”, una hidroxiapatita carbonatada con una relación Ca/P entre 1.69 y 1.67. El contenido de iones de carbonato es similar al del hueso [106].

La PHA es el producto final de la reacción de fraguado de todas las formulaciones comerciales de COFC de apatita. Sin embargo, los sistemas de Norian SRS[®] y BiocementD[®] se fraguan en aptita carbonatada (CAP; $\text{Ca}_{8.8}(\text{HPO}_4)_{0.7}(\text{PO}_4)_{4.5}(\text{CO}_3)_{0.7}(\text{OH})_{1.3}$) [106]. Los cementos de apatita son viscosos, moldeables pero tienden a ser resistentes en su aplicación en forma inyectable. Los cementos de apatita tienen un tiempo de fraguado muy largo. Un tiempo de fraguado menor se consigue mediante el uso de la mínima cantidad de la fase líquida necesaria para formar la pasta del cemento. Además, el uso de aditivos como el ácido fosfórico, MCPM, iones ortofosfatos y partículas de PHA ha sido eficiente en rebajar el tiempo de fraguado del cemento a 10-15 minutos [86].

Las propiedades mecánicas de los cementos de apatita varían ampliamente según la composición. El factor más determinante es la relación polvo líquido (P/L) del cemento. Una relación de P/L alta disminuye la porosidad del cemento. Las propiedades mecánicas disminuyen exponencialmente con el aumento de la porosidad. La fuerza de tensión aumenta 2 veces por cada 10 vol% del decaimiento en la porosidad, por ejemplo se la porosidad decae 20 Vol% la fuerza de tensión aumentará 40% [86].

Driessens et al. [111] han obtenido los siguientes valores de fuerza de compresión y el tiempo de fraguado de varias formulaciones comerciales de cementos de apatita:

- Norian SRS: 33 ± 5 MPa, 8.5 ± 0.5 min (50% porosidad).
- Cementek: 8 ± 2 MPa, 17 ± 1 min.

- Biocement D: 83 ± 4 MPa, 6.5 ± 0.5 min (40% Porosidad).
- α -BSM: 4 ± 1 MPa, 19 ± 1 min (80% porosidad).

La implantación de cementos de apatita *in vivo* ha demostrado que las propiedades mecánicas tienden a aumentar continuamente [112]. La biocompatibilidad de los cementos de apatita es excelente. Sin embargo, una respuesta inflamatoria podría ocurrir si el cemento no se fraguara [113]. Aunque, la biodegradabilidad de los cementos de apatita es mas alta que la de HA, la solubilidad del cemento es muy lenta, Young et al. han reportado que la cantidad de Norian SRS desminuyó 30%, 24 meses después su implantación en el fémur de conejo como modelo de experimentación animal [114]. Se pueden predecir diferencias en la biodegradabilidad de los cementos de apatita según el grado de la cristalinidad de PHA. El producto final de los cementos comerciales de apatita de Bonesource[®] y Biobone[®] es PHA muy cristalina. Eppley et al. no han observado ninguna resorción de Bonesource[®] después de varios años de su implantación, sin embargo, han observado reabsorción en el Biobone[®]. Esta diferencia se debe a que el Biobone[®] es mucho más poroso que el Bonesource[®]. [115] Así, parece que la porosidad del COFC es un factor muy importante para la degradabilidad del COFC.

❖ Cementos de OCP [79]

El interés en desarrollar un COFC cuyo producto final sea OCP (fosfato octacálcico) nace de que el OCP es precursor en la formación de apatitas de fosfato cálcico en los dientes, huesos y otros biominerales [116 y 117]. Además, el OCP es biocompatible, biodegradable y osteoconductor [86].

La isoterma de solubilidad del OCP se sitúa debajo de las isotermas de DCPA, DCPD, α -TCP y TTCP en un rango amplio de pH lo que significa que las soluciones de estas fases están supersaturadas en relación con el OCP (Figura 7). Desde el punto de vista termodinámico, el OCP puede precipitar de estas soluciones, sin embargo, el OCP es más soluble que el PHA lo que significa la formación de PHA como el producto final del proceso de fraguado. La formación de OCP vía la hidrólisis de un solo fase se ha favorecido mediante un control de la temperatura y el pH de la solución. La formación de OCP en un sistema formado solamente por α -TCP estaría favorecida en las siguientes combinaciones de temperatura y pH: (T = 40 °C, $5.5 < \text{pH} < 7.5$); (T = 60 °C, pH = 5); y (T = 70 °C, $4.5 < \text{pH} < 5.5$) [107 y 118]. Se puede observar que a temperatura

más alta, el rango óptimo de pH para la formación de OCP se desplaza a pH más ácido. Este comportamiento se debe a que la subida en la temperatura disminuye la solubilidad del α -TCP, así un pH más ácido sería necesario para aumentar la solubilidad del α -TCP.

Se ha observado que los tiempos de fraguado son mínimos y las fuerzas de compresión son máximas cuando la relación Ca/P del sistema de COFC es más cerca a la relación Ca/P del OCP. La mayoría de los autores justifica esta tendencia con la formación de OCP como el producto de la reacción de fraguado de mezclas con una relación de Ca/P = 1.33 [119]. Esta hipótesis se basa solamente en la termodinámica de la solubilidad mientras que el uso de las técnicas de difracción de rayos X (DRX) y/o infrarrojos (FTIR) ha fracasado en mostrar experimentalmente el OCP como un producto de la reacción de fraguado.

Estos resultados parecen indicar que no es posible preparar un cemento de OCP considerando solamente la estequiometría y/o la termodinámica. Además, el alto número de las condiciones experimentales necesarias para obtener el OCP y la baja eficiencia de estas reacciones a 37 °C indica la dificultad de desarrollar un cemento de OCP para aplicaciones clínicas donde el OCP está presente en altas cantidades.

❖ Cementos de ACP

Hasta el momento las reacciones que tienen lugar en estos sistemas han sido poco estudiadas. Solo han sido reportados dos sistemas que originan ACP como resultado del fraguado; uno basado en MCPM y CaKPO_4 y otro en MCPM y $\text{Ca}_2\text{NaK}(\text{PO}_4)_2$. [120] Se caracterizan por poseer un componente fuertemente ácido (MCPM) y otro fuertemente básico (CaKPO_4 o $\text{Ca}_2\text{NaK}(\text{PO}_4)_2$), y ambos muy solubles. Esas características garantizan una rápida solubilización de los componentes, alcanzándose condiciones de sobresaturación con respecto a la HA, pero de acuerdo con la Regla de Ostwald, en lugar de ésta precipita ACP. Este ACP es posteriormente transformado a CDHA por recristalización.

El fraguado en estos cementos es consecuencia de un mecanismo sol-gel. Estos cementos fraguan muy rápido y necesitan ser retardados mediante la adición de compuestos no-reactivos. La fuerza de compresión por lo general no supera los 15 MPa [13].

❖ Cementos de DCPD [79]

DCPD y DCPA son las fases más estables en el rango de pH 2-4.5. Así, el DCPD es el precipitado obtenido de una solución de un fosfato cálcico más alcalino que el DCPD y DCPA a temperatura ambiente o corporal. El diagrama de solubilidad muestra que el DCPD es más estable que el α -TCP en un rango de pH < 7 . La formación de DCPD vía la hidrólisis del α -TCP a pH < 5.5 y temperatura de 37 °C esta favorecida termodinámicamente. El MCPM es la fase más estable a pH < 2 , la disolución del MCPM en el rango de pH 2-4.5 provoca la precipitación de DCPD como la fase más estable. El resultado de Mirtchi et al coincide con las conclusiones termodinámicas sobre la formación del DCPD como el producto final de la reacción de fraguado en el cemento compuesto por β -TCP + MCPM [121].

Varias composiciones se han propuesto para obtener cemento de brushita: β -TCP + MCPM, β -TCP + H_3PO_4 y TTCP + MCPM + CaO [85, 122 y 123]. La reacción de fraguado de cementos de brushita es una reacción ácido-base. La pasta del cemento de brushita es ácida durante el proceso de fraguado debido a que la brushita solo se puede precipitar a pH < 6 [120]. Después del fraguado, el pH del cemento se aproxima hacia el pH de equilibrio [124]. Si la mezcla del cemento tiene fosfato cálcico alcalino en exceso, el pH del equilibrio será el pH correspondiente a la intersección de los diagramas de solubilidad del componente alcalino y de la brushite. Por ejemplo, los valores de pH de equilibrio de las combinaciones de β -TCP + MCPM, HA + MCPM y TTCP + MCPM son 5.9, 4.2 y 7.6, respectivamente [86].

El tiempo de fraguado de los cementos de brushita depende en mayor grado de la solubilidad del componente alcalino, a mayor solubilidad, mas corto es el tiempo de fraguado. El tiempo de fraguado de HA + MCPM es de unos minutos, para el β -TCP + MCPM es de 30-60 segundos y para el α -TCP + MCPM es de unos segundos [85 y 125]. Así, la reacción de fraguado del cemento de brushita procede a una velocidad muy alta lo que requiere el uso de retardantes para facilitar el manejo clínico del cemento. Se han empleado los ácido carboxílicos como el ácido cítrico, el ácido glicólico y el ácido tartárico como inhibidores de la reacción de fraguado del cemento de brushita. Además, los iones de pirofosfato se han utilizado como retardante para la reacción de fraguado de cemento de brushita [126]. Los iones de pirofosfato se adsorben al núcleo de la sal cálcico y impiden la incorporación de más iones a la red del cristal previniendo el

crecimiento cristalino y la agregación de los cristales [127 y 128]. Además, los iones de pirofosfato pueden inhibir la disolución del fosfato tricálcico- β [129]. Se ha reportado que el aumento en la concentración de los iones de pirofosfato mejoró la tensión diametral de los cementos de brushita [126 y 130].

La inhibición del crecimiento de los cristales de brushita resulta en cristales de menor tamaño y mejora su empaquetamiento aumentando la fuerza mecánica de los cementos de brushita. Además, la fuerza mecánica de los cementos de brushita mejora al disminuir la porosidad aumentando su densidad. [129] La porosidad esta relacionada inversamente y exponencialmente con la fuerza mecánica del cemento [131].

Los cementos de brushita son más débiles que los cementos de apatita. Generalmente, la fuerza de compresión de cementos de brushita es menor de 15 MPa [132]. Se ha reportado un cemento de brushita con una fuerza de tensión de 10 MPa y de compresión de 60 MPa [133]. Los cementos de apatita pueden alcanzar una fuerza de tensión de 16 MPa y de compresión de 83 MPa [111 y 134]. La implantación *in vivo* de cementos de brushita, al contrario de cementos de apatita, desminuye sus propiedades mecánicas debido a la alta solubilidad de brushita [135]. Sin embargo, las propiedades mecánicas de brushita aumentan después de unas semanas de su implantación *in vivo* debido al crecimiento óseo [135].

La degradación de cemento de brushita se ha estudiado en tampón fosfato y suero [136]. Se ha observado que la pérdida de peso del cemento aumenta al incrementar el volumen de la solución incubadora. Además, la renovación del medio incubador aumenta la pérdida de peso del cemento favoreciendo la transformación de brushita a hidroxiapatita. Así, el mantenimiento de la disolución de brushita favorece su transformación a hidroxiapatita [137]. Dicha transformación hace que el cemento de brushita pierda su gran ventaja de ser biodegradable [137]. Los cementos de brushita son biocompatibles aunque se han reportado reacciones inflamatorias al implantar cantidades grandes del cemento [138]. Nuevos resultados indican que dichas reacciones inflamatorias pueden ser provocadas por la transformación de brushita a hidroxiapatita según la reacción (5) liberando cantidades grandes de ácido fosforico.

Se han empleado las sales de magnesio poco solubles en agua [137] y el ácido pirofosfórico [139] para inhibir la transformación de brushita a hidroxiapatita. Las sales

de magnesio se adsorben a la superficie del núcleo recién formado de hidroxiapatita previniendo su crecimiento [140].

- Propiedades biológicas de COFC [13]

Los fluidos fisiológicos como la sangre y el líquido extracelular contienen iones de fosfato y calcio. Así, el comportamiento de los fosfatos cálcicos después de ser implantados *in vivo* depende del grado de saturación de los fluidos corporales. Estos fluidos, a pH 7.4, son supersaturados con respecto a HA, saturados con CDHA y CA, y subsaturados con respecto a CaCO_3 , DCPA y DCPD. Por lo tanto, se espera que el CaCO_3 , el DCPA y el DCPD tiendan a disolverse en dichos fluidos. Una disolución mas rápida se espera para los implantes de yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Las células pueden cambiar el pH de su entorno local. El pH en el entorno de los macrófagos y los osteoclastos puede llegar hasta 5, mediante la excreción del ácido láctico, mientras que el pH en el entorno de los osteoblastos puede llegar hasta 8.5 mediante la excreción de amonio. Generalmente, los fosfatos cálcicos tienen una solubilidad alta a valores bajos de pH y viceversa. Así, la actividad osteoclastica puede disolver CDHA, CA hasta una disolución lenta de HA. Mientras, la actividad osteoblastica induce el crecimiento de los cristales de HA, CDHA y CA [89 y 141].

A continuación, se procede a estudiar las propiedades biológicas de COFC en cuatro grupos: COFC que tienen yeso, COFC de brushite, COFC de CDHA y CA, y COFC de HA.

❖ COFC que tienen yeso

El uso de yeso fue descartado debido a su reabsorción muy rápida sin producir un crecimiento óseo apreciable. Bohnner et al han implantado un cemento mixto de yeso y DCPD en la epífisis distal del fémur de conejo como modelo de experimentación animal. Los animales fueron sacrificados a las 4, 8 y 16 semanas [142]. Los resultados indican que los cilindros del cemento fueron rodeados con hueso esponjoso nuevo en 4 semanas. Después de 8 semanas, la mayor parte del cemento se reemplazó con hueso esponjoso. El cemento fue totalmente reemplazado por hueso esponjoso en 16 semanas. Ohura et al mostraron que la estructura ósea resultada de la implantación de este cemento puede ser más densa al usar β -TCP en exceso en la composición del polvo del cemento [143]. Este

resultado sugiere que parte de estos cementos (yeso) se disuelve sin estimular el crecimiento óseo.

❖ COFC de DCPD

Varios procesos están involucrados en la biodegradación del cemento de brushita incluyendo la disolución, la fragmentación, la transformación a hidroxiapatita [123, 138 y 144] y la fagocitosis de las partículas del cemento por macrófagos [145]. En un estudio reciente, no se han observado *in vitro* partículas de cemento de brushita fagocitadas por una línea celular de macrófagos. Sin embargo, se han observado las extensiones celulares de los macrófagos penetrando la superficie del cemento y rodeando las partículas del cemento [146]. Así, la biodegradación del cemento de brushita es más rápida que los cementos de apatita y se ha medido una velocidad lineal de degradación de 0.25 mm/semana para cemento de brushita [147]. Esta degradación rápida podría resultar en la formación de hueso inmaduro. Este problema se puede solucionar vía la adición de gránulos de β -TCP que sirven como anclaje para el hueso y promueven la formación de hueso maduro [147].

Tamimi et al han implantado granulados de cementos de brushita fraguados con ácido glicólico (el tamaño de los gránulos oscila entre 0.2-1mm) utilizando el modelo de la cámara de titanio [148]. En este modelo un cilindro de titanio se ha insertado en una hendidura de 2-3 mm de profundidad en la calota de un modelo de experimentación animal (conejo). Se ha observado la formación de trabéculas óseas neoformadas de la superficie externa del hueso parietal invadiendo los gránulos del cemento y no se han observado signos de reacción inflamatoria. Además, la superficie de los gránulos mostraba signos de reabsorción como las células fagocíticas multinucleares/mononucleares formando lagunas de Howship y desgaste de la superficie de los gránulos [148].

La implantación de cilindros de cemento de brushita (chronOsTM inject, RMS Foundation) en defectos óseos críticos usando cabra como modelo de experimentación animal ha mostrado que la reabsorción de la brushita es más rápida que la de los gránulos de β -TCP. La frontera de la formación de nuevo hueso sigue directamente la frontera de la reabsorción del cemento. Se han observado los gránulos residuales de β -TCP incluidos en el hueso nuevo. La reabsorción del cemento ocurre vía:

- la disolución del cemento en el líquido extracelular, la desintegración y la formación de partículas.
- fagocitosis de las partículas del cemento por los macrófagos.

Los signos de inflamación o una respuesta inmunológica no se han observado en ningún tiempo de observación. La degradación del cemento y la formación de nuevo hueso es ligeramente más rápido en los defectos del fémur que en la tibia [145].

Sin embargo, Constantz et al han observado que la transformación de DCPD a apatita después de su implantación en modelo de experimentación animal (conejo). Dicha transformación es más rápida y extensa en los defectos hechos en la metáfisis que en la diáfisis. Una explicación de este comportamiento puede ser que la vascularización y la transmisión del estrés mecánico son más altas en el metáfisis que en la diáfisis [149].

❖ COFC de CDHA y CA

Driessens et al han implantado cemento de CDHA con una relación Ca/P de 1.51 y cemento de CDHA con una relación Ca/P de 1.37 (30% DCPA). Después de 8 semanas de la implantación *in vivo* la relación Ca/P era 1.52 y 1.38 respectivamente. Los cementos han mantenido la fuerza de tensión diametral y su estructura cristalina. Esto indica que la CDHA y DCPA son estructuralmente estables [150]. Este comportamiento se explica como consecuencia de que el fluido extracelular se encuentra en equilibrio fisicoquímico con ambas fases de CDHA y DCPA.

Las observaciones histológicas en modelos de experimentación animal como conejo, cabra y cordero han mostrado que estos cementos se transforman progresivamente en hueso nuevo manteniendo la integridad de la estructura material-hueso. La osteotransducción es más rápida en conejos, lento en cabras y muy lento en corderos [151 y 152]. Lo que indica que la osteotransducción está regulada por los proceso de remodelado óseo locales y es especie dependiente.

Los experimentos de cultivo celular han mostrado que este CDHA se biodegrada por osteoclastos [153]. Además, se ha mostrado que el material promocionó la diferenciación de las células osteoprogenitoras de la médula ósea [154]. Su biocompatibilidad es excelente debido a su pH muy cerca al pH neutro [155].

Norian Fracture Grout, un cemento comercial de CA, esta compuesto de una mezcla de TTCP, CaCO_3 , cristales de H_3PO_4 y una solución diluida de fosfato sódico [156]. Se ha implantado el cemento en los huesos largos cerca de la epífisis en un modelo de experimentación animal (perro). Inicialmente, la tracción de fracaso es 50% menor en el lado osteometizado que en el control contralateral. Sin embargo, dichas diferencias desaparecieron a las 8 semanas de la implantación. El cemento era osteoconductor y se pudo observar evidencias de reabsorción en 16 semanas. La formación y el remodelado óseo eran más rápidos en la periferia de la metáfisis mientras en el centro de la metáfisis eran distribuidos al azar. El mismo cemento fue utilizado para cementar endoprótesis de titanio en el fémur de perro como modelo de experimentación animal [157]. Los animales empezaron a apoyarse en 24 h después de su implantación con una recuperación completa de función en un mes. Un espacio de 20-30 μm se ha observado en la interfase cemento-implante. En la interfase cemento-hueso, se ha observado la transformación del cemento a hueso lamelar.

El Norian Skeletal Repair System es un cemento de CA que esta compuesto de una mezcla de α -TCP, CaCO_3 , MCPM y una solución diluida de fosfato sódico. Este cemento ha mostrado una buena osteointegración cuando se ha utilizado para cementar un endoprótesis femoral metálica [158]. Se ha argumentado su uso para la augmentación de fracturas de Colles [159].

❖ COFC de HA

Se han experimentado la osteotransducción de cementos de HA basados en TTCP y, DCPA o DCPD en gatos como modelo de experimentación animal. Seis semanas después de su implantación en el seno frontal, la reabsorción del material y la formación de nuevo hueso eran muy escasas. En 12 semanas, 30% del área reconstruida fue rellenada por hueso inmaduro. En 18 meses, el crecimiento óseo era 63% del área y 10% del implante fue reemplazado por un tejido fibrovascular [160].

La respuesta de los tejidos blandos a estos materiales es importante en aplicaciones como su uso endodóntico. El material fue rodeada por un tejido fibroconjuntivo delegado con un numero pequeño de linfocitos y células plasmáticas después de un mes de su implantación subcutánea en modelo animal de rata [161]. En gatos, se ha observado una reacción inflamatoria transitoria y su reabsorción en función del tiempo

[162]. Los cultivos *in vitro* con osteoblastos ha mostrado la deposición de una matriz colágena con puntos electrodensos en la superficie del material [163].

La implantación del cemento de HA basado en la mezcla de α -TCP/DCPD/DCPA y modificado con el succinato sódico y el chondroitin sulfato sódico en modelo animal de conejos ha mostrado una respuesta similar a la HA cerámica [164]. La reabsorción aumenta con el tiempo especialmente después de 12 meses [165].

Un cemento de HA basado en TTCP, DCPD y citrato se ha osteointegrado después de 2 semanas de su implantación en la tibia de un modelo animal de perro [166]. La respuesta fue también similar a la de HA cerámica. Un comportamiento igual fue descrito para las formulaciones que tienen carboximetilcelulosa [167]. Por lo tanto, La osteotransducción de los cementos de HA es significativamente más lenta que la de los cementos de CDHA y CA.

COFC como portadores de sustancias biológicamente activas [13]

La incorporación de sustancias biológicamente y farmacéuticamente activas en la matriz de COFC y su posterior liberación se ven favorecidas por las siguientes características:

- ❖ Se puede fácilmente añadir las sustancias activas a la fase sólida o bien a la fase líquida de un sistema de COFC.
- ❖ La porosidad del COFC fraguado permite el intercambio y la liberación de estas sustancias a los fluidos fisiológicos.
- ❖ La plasticidad de la pasta del cemento permite la adaptación del cemento al defecto óseo.
- ❖ La reacción exotérmica del fraguado del COFC libera cantidades de calor que no afectan principios proteicos de alta sensibilidad térmica.

Otsuka et al fueron los primeros en proponer la incorporación de medicamentos en la matriz cristalina y microporosa de los COFC [168]. Los autores investigaron la liberación *in vitro* de cefalexina y norfloxacin como droga modelo en un cemento de HA basado en TTCP + DCPD. El perfil de la liberación se siguió durante 250 h y se encontró que se ajustaba a la ecuación de Higuchi:

$$Mt = [D_{ef}C_s(2C_d - \varepsilon C_s)t]^{1/2} \quad (20).$$

dónde M_t es la cantidad de medicamento por unidad de área liberada en el tiempo t , D_{ef} es la difusividad efectiva, en cm^2/s , en el medio existente dentro del poro del cemento, C_s es la solubilidad molar, C_d es la concentración del medicamento y ε es la porosidad.

Nachiondo et al estudiaron el efecto de la adición de sulfato de gentamicina a un COFC de tipo no especificado. La presencia de 0.15 % del antibiótico no afectó el tiempo de fraguado, la fuerza de compresión ni la inyectabilidad. Sin embargo, un 3.3 % de antibiótico afectó significativamente la fuerza del cemento. Según la liberación *in vitro* del antibiótico, el sistema es adecuado para la prevención y el tratamiento de la osteomielitis [169]. Takano et al incorporaron gentamicina a microesferas de ácido poliláctico y estas a su vez fueron recubiertas con un cemento de HA compuesto por α -TCP + DCPD + TTCP. Se implantó el cemento fraguado en un modelo animal de conejo y se estudió la liberación de gentamicina durante un período de dos meses. La concentración de gentamicina local y en los riñones fue alta pero no en otros tejidos indicando que el cemento es adecuado para el tratamiento de osteomielitis [170].

Hamanishi et al estudiaron la liberación *in vitro* de vancomicina de un cemento de HA compuesto por TTCP + DCPD. La concentración del antibiótico en el cemento fue 1% y 5%, la liberación se mantuvo durante 2 y 9 semanas, respectivamente. La concentración liberada después de 3 semanas de la implantación en médula ósea es 20 veces superior a la concentración mínima inhibitoria para el *Staphylococcus aureus* [171].

Kamegai et al utilizaron un cemento de HA basado en TTCP + DCPD como portador para proteína morfogénica ósea (BMP). La implantación del cemento en músculo de ratón resultó en la formación de tejido óseo. Cuando el cemento con BMP se implantó en el sitio de una osteotomía de 5 mm de longitud realizada en fémur de ratón se produjo la total regeneración del defecto y la reabsorción del cemento al cabo de 6 semanas [172].

Ohura et al impregnaron cilindros (4 X 5 mm) de un cemento de brushita que tiene yeso con dos concentraciones de rhBMP-2 (1.26 y 6.28 μg) y los implantaron en defectos segmentales creados en fémur de rata. A las tres semanas, los defectos tratados con el cemento con la alta concentración de rhBMP-2 manifestaron evidencias radiográficas de unión en todos los defectos tratados y la resistencia a torsión del hueso consolidado fue igual a la alcanzada en 9 semanas en defectos control implantados sin

BMP. Mientras, el cemento impregnado con la dosis baja de rhBMP-2 resultó en la unión radiográfica en solo 40% de los defectos tratados [173].

Bohner et al. estudiaron el efecto del sulfato de gentamicina en cemento de brushita constituido por β -TCP + MCPM. La adición de 3 a 16 % del antibiótico aumentó el tiempo de fraguado y la resistencia del cemento. El perfil de la liberación siguió el modelo de difusión ($M_t/t^{1/2} = k$) hasta una fracción liberada de 0,5. La presencia de hidroxipropilcelulosa y ácido poliacrílico disminuyeron ligeramente la fracción máxima liberada. La velocidad de la liberación disminuyó con el aumento de la concentración del antibiótico en el cemento, debido al efecto del ión sulfato en la microestructura del cemento [174].

La modificación de cemento de brushita con doxiciclina hclato ha aumentado su tiempo de fraguado y sus propiedades mecánicas. Los experimentos de liberación han mostrado que 50% de la dosis inicial del antibiótico se ha liberado durante las primeras 5 h de incubación en tampón fosfato (pH = 7.4) mientras que *ca.* el 75% de la dosis inicial fue liberado durante 4 días. Este comportamiento se debe al efecto combinado de una cinética de difusión y la interacción del antibiótico con los iones de calcio de brushita [175].

Gbureck et al estudiaron la adsorción de vancomicina, ofloxacina y tetraciclina a la superficie de cementos de brushita y hidroxiapatita, y de monetita preparados con la técnica de impresión 3D. En tiempo de incubación corto (1 h), se ha demostrado que la cantidad del antibiótico adsorbida es linealmente proporcional a su concentración en el líquido de incubación. La adsorción del antibiótico es mayor en el orden de HA > monetita > brushita. A una concentración fija del antibiótico, la cantidad adsorbida en relación con el tiempo de incubación sigue el modelo de Korsmeyer-Peppas [176].

La vancomicina y la ofloxacina se liberan rápidamente de la superficie del fosfato cálcico en 1-2 días mientras que la liberación de la tetraciclina del cemento de brushita es más lenta ya que solo el 25-30% del antibiótico se liberó durante 24 h. El resto de la tetraciclina esta unido a la matriz del cemento de manera irreversible mediante el efecto quelante de la tetraciclina. La cinética de la liberación de los antibióticos es exponencial en función del tiempo y sigue el modelo de Weibull [176].

6.3 ESTRONCIO (Sr)

Es un elemento altamente distribuido en la naturaleza, con una estructura química similar a la del calcio, lo que le otorga unas propiedades muy parecidas a este elemento. Una importante fuente de aporte es la alimentación. La distribución ósea del estroncio es proporcional a los niveles plasmáticos, la duración de la exposición y el sexo. El paso del estroncio al hueso está influido por el recambio óseo. Por tanto, el hueso cortical tiene menor contenido de estroncio que el trabecular.

La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una insuficiencia de masa ósea y un deterioro estructural del tejido óseo que provoca un aumento de la susceptibilidad a las fracturas, por lo general de cadera, columna y muñeca [177]. Las fracturas de cadera se consideran la mayor carga, ya que casi siempre requieren hospitalización, son fatales en un 20% de casos, y provocan discapacidad permanente en casi la mitad de los pacientes.

La pérdida ósea resultante en osteoporosis es principalmente consecuencia del envejecimiento normal, pero también puede ocurrir debido a un deterioro del desarrollo de la masa ósea máxima o a la pérdida excesiva en la adultez. A medida que las poblaciones envejecen, aumentará el número de fracturas osteoporóticas en las personas de edad. Otros factores de riesgo, como la urbanización, y el consiguiente incremento de las superficies duras, también harán aumentar el número de fracturas.

La osteoporosis es una enfermedad muy frecuente, pero su prevalencia real es difícil de establecer, ya que es una enfermedad asintomática hasta la aparición de complicaciones, lo que hace difícil la identificación de las personas que padecen la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia se estima en un 30% de las mujeres caucásicas y en un 8% de los varones caucásicos mayores de 50 años, y asciende hasta un 50% en mujeres de más de 70 años [178]. La osteoporosis es un problema de salud pública global que afecta actualmente a más de 200 millones de personas en el mundo. Cerca de 3,5 millones de personas la padecen en España, la mayor parte de las cuales son mujeres. Afecta a un 35% de mujeres españolas mayores de 50 años, porcentaje que se eleva a un 52% en las mayores de 70 años. Además, cada año se producen más de 100.000 fracturas osteoporóticas. La densidad ósea también

disminuye con la edad, de tal manera que la incidencia de fracturas aumenta exponencialmente y es un problema importante en la población geriátrica, siendo este un sector demográfico con clara tendencia ascendente en España. Constituye pues, la osteoporosis, un problema de salud pública de gran magnitud por su prevalencia, por la elevada morbi-mortalidad que conlleva y por el enorme consumo de recursos que ocasiona.

Así, el tratamiento de fracturas óseas provocadas por osteoporosis cuesta a los servicios sanitarios en Europa alrededor de €30 billones por año [179]. Un tercio de los pacientes con osteoporosis y fracturas en las vértebras sufre pérdidas de altura, dolor crónico y dificultades en las actividades cotidianas de la vida [180]. Hay un gran interés en la incorporación del estroncio en los cementos óseos de fosfatos cálcicos debido a su eficacia en el tratamiento de osteoporosis [181-185]. Se ha observado *in vitro* que el estroncio produce un aumento de la formación ósea y una disminución de la resorción. El ranelato de estroncio se ha manifestado como un fármaco anti-resortivo, con un probable componente osteoformador, que puede tener un papel importante en el futuro para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica. Esta eficacia del estroncio resulta de su capacidad de prevenir la pérdida ósea. Se ha demostrado *in vitro* que los iones de estroncio Sr^{2+} inhiben la diferenciación [181] y la actividad de la resorción ósea de los osteoclastos [182]. Además, los iones de estroncio Sr^{2+} provocan el apoptosis de los osteoclastos [183] pero mejora la proliferación de las células pre-osteoblastos y la síntesis del colágeno [184]. Así, los iones de estroncio inhiben la resorción ósea y mantienen la formación ósea. Además, se ha mostrado que los cementos iónicos que tienen estroncio son más osteoconductoras que los cementos iónicos que tienen zinc [185].

La relación directa entre la osteoporosis y la pérdida ósea a nivel de los maxilares, ha suscitado frecuentes controversias, pero al igual que los efectos de la osteoporosis se observan típicamente en las vértebras y en los huesos largos, también podría producirse en otros huesos incluyendo los huesos maxilares [186]. Esta alteración en el metabolismo óseo podría modificar la capacidad de formación de hueso alrededor de los implantes y el éxito de las técnicas de regeneración ósea [187].

Se ha encontrado empíricamente que la sustitución iónica extensiva en un cristal ocurre cuando la valencia del ión reemplazante es dentro de una unidad de la valencia del ión reemplazado y cuando el radio de los dos iones es similar. Los iones de calcio y estroncio cumplen estos dos requisitos y los dos iones pueden ocupar el mismo sitio en un cristal resultando en posibilidades de formar soluciones sólidas. Se ha estudiado la sustitución iónica del calcio por estroncio en fosfato cálcico amorfo, apatita, hidroxiapatita, fosfato octacálcico y brushita [188]. Debido a que todos los sitios del calcio en la red de brushita se pueden ocupar por estroncio, la sustitución iónica del calcio por estroncio en el cristal de brushita es la más eficiente [189]. La sustitución iónica del calcio por estroncio en el cristal de hidroxiapatita causa una expansión en la red del cristal [189 y 190], aumentando la disolución de los iones de calcio y fosfato. Eso provocó la re-precipitación de una capa más gruesa de apatita que sirve para unir el injerto con el hueso [191]. Leroux et al sintetizaron hidroxiapatita sustituida parcialmente por estroncio vía sistema de cemento iónico de fosfato cálcico [192]. Sin embargo, la presencia de una cantidad significativa de impurezas de nitrato impidió su aplicación clínica. Se ha desarrollado recientemente un cemento novedoso de hidroxiapatita sustituida parcialmente con estroncio libre de impurezas de nitrato en el producto final de la reacción de fraguado [193].

7. Material y métodos

7.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Materiales comerciales

Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), fosfato monocálcico (MCP), carbonato cálcico (CC), pirofosfato sódico, ácido glicólico, ácido hialurónico de un peso molecular de 1640 KDa, y chondroitin 4 sulfato (C4S) se adquirieron en Sigma-Aldrich con el mayor grado de pureza. Carbonato de estroncio (SrCO_3), cloruro de estroncio, ácido tartárico L (+) y D (-), ácido cítrico, ácido fosforico, aerosil y hidróxido sódico son de Panreac y del mayor grado de pureza.

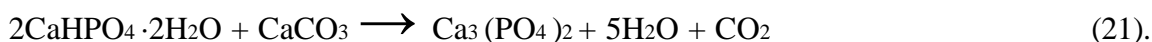
Materiales sintetizados en el Laboratorio

Fosfato tricálcico-beta (β -TCP)

El β -TCP ha sido sintetizado en nuestro Laboratorio y para ello se han empleado dos procedimientos:

Procedimiento A

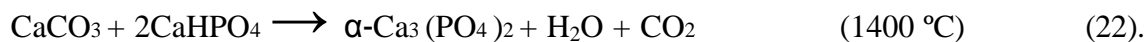
Se mezclan 34.42 g de DCPD y 10.01 g CC (en relación molar 2:1) en un mortero de cristal y se homogenizó con mano durante 15 minutos. Se calienta la mezcla en horno (Heraues) a 900 °C durante 14 horas. La síntesis del β -TCP ocurre según la reacción:



Procedimiento B

Se mezclan DCPA y CC en una relación molar de 2:1 en isopropanol con agitación magnética durante 60 minutos. Se filtra la solución en vacío y se deja secar a temperatura ambiente en una campana de flujo durante 24 horas. Después, se sinteriza la mezcla en un horno (Veckstar) a 1400 °C durante 12 horas y a 1000 °C durante 6 h.

La reacción química a 1400 °C resulta en la formación de α -TCP según la reacción 22. A una temperatura de 1000 °C, el α -TCP se transforma a β -TCP (Reacción 23) la forma de fosfato tricálcico mas estable a temperaturas por debajo de 1125 °C [194].



A continuación se molió la masa sólida en mortero de porcelana con mano, se pasaron los gránulos por un tamiz con tamaño de poro de 322 μm y se procesó el polvo en molino de bolas de oxido de zirconio a 200 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos.

β -TCP sustituido parcialmente por estroncio (Sr)

Se ha empleado el procedimiento B en la síntesis de β -TCP sustituido parcialmente por estroncio (Sr- β -TCP). Para ello, se sustituyó el CC por carbonato de estroncio a distintos porcentajes molares (Tabla I).

Tabla I. Composición de las mezcla de fosfato cálcico para la preparación de β -TCP sustituido parcialmente por estroncio (Sr- β -TCP).

No.	CaHPO ₄ [mol]	CaCO ₃ [mol]	SrCO ₃ [mol]	Formula (Sr- β -TCP)	Sr/[Sr+Ca] [%]
1	2	1.00	-	Ca ₃ (PO ₄) ₂	0
2	2	0.80	0.20	Ca _{2.8} Sr _{0.2} (PO ₄) ₂	6.7
3	2	0.60	0.40	Ca _{2.6} Sr _{0.4} (PO ₄) ₂	13.3
4	2	0.40	0.60	Ca _{2.4} Sr _{0.6} (PO ₄) ₂	20.0
5	2	0.20	0.80	Ca _{2.2} Sr _{0.8} (PO ₄) ₂	26.7
6	2	-	1.00	Ca ₂ Sr(PO ₄) ₂	33.3

Solución tampón de fosfato

Se utilizó un tampón fosfato de pH 7.4 como medio incubador y para prepararlo se disolvieron 2.76 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 138 \text{ g/mol}$) en 100 ml de agua bidestilada (solución A) y 2.83 g de Na_2HPO_4 ($M_w = 142 \text{ g/mol}$) en 100 ml de agua bidestilada (solución B). Se mezclaron 19 ml de solución A y 81 ml de solución B con agitación magnética para preparar 200 ml de tampón fosfato con pH 7.4. Se guardó el tampón a una temperatura de 4 °C.

Preparación de cemento cálcico

Preparación de la fase sólida

La fase sólida del cemento cálcico consta de un fosfato cálcico básico y/o fosfato cálcico ácido. El fosfato cálcico básico era el β -TCP o Sr- β -TCP y el fosfato cálcico ácido era monofosfato cálcico. Se mezclaron los dos componentes en una relación molar de 1.785 o 1.324 en mortero con mano o en molinillo. Se ha empleado el pirofosfato sódico como retardante de la reacción de fraguado.

En unos experimentos se modificó la fase sólida añadiendo cloruro de estroncio (SrCl_2) en concentraciones de 1%, 2%, 3%, 5%, 8% y 10% (peso/peso). La concentración del pirofosfato sódico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) es de 0.54%, 1.08%, 2.16%, 3.24%, 4.32% y 5.4% (peso/peso).

Preparación de la fase líquida

Aparte del agua bidestilada y el ácido fosforico (2M), se han empleado las siguientes fases líquidas en la preparación del cemento:

Soluciones de ácidos carboxílicos

Se ha preparado soluciones acuosas de ácido cítrico (0.5M), ácido glicólico (1M), ácido tartárico (0.5 M). Se han seleccionado las concentraciones que han permitido obtener cementos con las mejores propiedades mecánicas [195 y 196]. La Tabla II muestra el pH de las soluciones acuosas medido con un pH-metro MP230 (Mettler-Toledo, Barcelona, España).

Tabla II. Molaridad y pH de los ácidos empleados en la fase líquida del cemento.

Ácido	pH	Número de grupos carboxílicos
2M ácido fosforico	0.64 ± 0.01	0
0.5M ácido cítrico	1.74 ± 0.01	3
0.5M ácido tartárico	1.76 ± 0.01	2
1M ácido glicólico	1.84 ± 0.01	1

Ácidos carboxílicos y gel de sílice

Se preparó el gel de sílice fundiendo 6 g de aerosil en solución de hidróxido sódico 4M a 200 °C obteniendo una solución transparente de silicato. Se enrasa la solución de silicato con agua bidestilada hasta 100 ml. Se obtiene una solución de 60 g (SiO₂) por litro con un pH entre 11-12. La gelificación de la solución de silicato se indujo por la adición de ácido cítrico (sólido), ácido tartárico (sólido) y ácido glicólico (líquido). La Tabla III presenta el pH de los geles de sílice preparados.

Disoluciones de C4S y ácido hialurónico

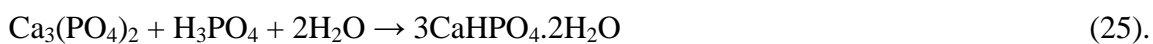
Se ha modificado la solución acuosa de 0.5M ácido cítrico con ácido hialurónico de peso molecular (Mw) de 1640 KDa y chondroitin 4 sulfato (C4S) en una concentración de 0.005 g/ml. La viscosidad de las soluciones fue medida con un viscosímetro tipo Couette a 25 °C. Se hicieron medidas a distintas velocidades de cizalla y a continuación se extrapoló la viscosidad a una velocidad de cizalla igual a cero.

Tabla III. Composición y pH de los geles de sílice.

Gel de sílice	pH
0.5M ácido cítrico en 16.8 g/l (SiO ₂)	4.39 ± 0.02
0.5M ácido tartárico in 16.8 g/l (SiO ₂)	4.52 ± 0.02
0.5M ácido glicólico en 16.8 g/l (SiO ₂)	4.71 ± 0.02

Síntesis de cemento de fosfato cálcico

Se pesó 1 g de la fase sólida y se mezcló con la fase líquida en una relación polvo líquida (P/L) de 2.5, 3, 4 o 5 en una placa de vidrio durante 30 s. Se fabricaron las muestras del COFC rellenando la pasta del cemento en moldes de silicona. Se fraguó el cemento durante 30 minutos en baño de agua a 37 °C. El proceso de fraguado del cemento ocurre según las reacciones:



7.2 MÉTODOS

Cabe mencionar que la síntesis y caracterización de los materiales preparados en esta tesis se llevaron a cabo en el Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Los ensayos *in vivo* se realizaron en el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Los trabajos relacionados con el uso de β -TCP sustituido por estroncio fueron realizados en “Department for Functional Materials in Medicine and Dentistry, School of Dentistry, University of Würzburg, Würzburg, Germany”.

Determinación de tiempo de fraguado final (FST)

El tiempo de fraguado final de la pasta del cemento se determinó utilizando la aguja de Vicat (ProETI) y la aguja de Gillmore. Se realizó la prueba de la aguja Vicat de acuerdo con el estándar internacional ISO1566 para los cementos dentales de fosfato de zinc. Se realizó la prueba cada 30 segundos. Se rellenaron cilindros de polietileno con la pasta del cemento y se consideró el cemento fraguado cuando la aguja de Vicat con punta de diámetro de 1mm y cargada con peso de 400 g había sido incapaz de dejar indentación circular y visible en la superficie del cemento [197]. Se realizó la prueba a temperatura y humedad relativa ambientes (20-23 °C y 50-60%).

Se realizó la prueba de la aguja de Gillmore de acuerdo con el estándar ASTM [198]. Se enrasó un portamuestra metálico con la pasta del cemento y a continuación se colocó en una cámara húmeda. Se realizó la prueba cada 30 segundos y se consideró el cemento como fraguado cuando la aguja de Gillmore con punta de diámetro de 2.117mm y cargada con peso de 13.98 g había sido incapaz de dejar indentación circular y visible en la superficie del cemento. Esta prueba se realizó en condiciones de temperatura y humedad relativa de 20-23 °C y 50-60%, y 37 °C y humedad relativa > 90%.

Fuerza de tensión diametral

Se prepararon las muestras rellenando moldes de silicona con un diámetro de 8 mm y 4 mm de espesor. Se fraguaron las muestras en un baño de agua a 37 °C y humedad relativa > 90%. Se utilizaron por lo menos 5 muestras cilíndricas de cemento cálcico. Se

sumergieron las muestras en viales de cristal con 10 mm de agua bidestilada durante 24 h (horas). Después, se procedió a medir la fuerza necesaria para romper el cilindro del cemento cálcico utilizando un durómetro (Pharmatest) a una velocidad de aplicación de carga 1mm/min. Se calculó la fuerza de tensión diametral (DTS) utilizando la formula:

$$DTS = 2 * F / (\pi * D * E) \quad (26).$$

dónde DTS (MPa), F: la fuerza en Newton, D: el diámetro de la muestra en mm, E: espesor de la muestra en mm.

Se calculó la media \pm SD (desviación estándar) para los valores de DTS obtenidos para cada formulación de cemento (Origin 7.1).

Fuerza de compresión

Se prepararon las muestras rellenando moldes de silicona con una longitud de 12 mm y 6 mm de espesor. Se fraguaron las muestras en un baño de agua a 37 °C y humedad relativa > 90%. Se utilizaron 12 muestras de cemento cálcico. Se sumergieron las muestras en viales de cristal con 10 mm de agua bidestilada durante 24 h. Después, se procedió a medir la fuerza de compresión (CS) necesaria para romper los paralelepípedos del cemento cálcico utilizando el aparato de ensayo mecánico estático Zwick 1440 (Zwick, Ulm, Alemania) con una unidad de carga de 5 KN. Se calculó la media \pm SD (desviación estándar) para los valores de CS obtenidos para cada formulación de cemento (Origin 7.1).

Determinación de la porosidad

Se han utilizado mínimamente 3 muestras paralelepípedicas. Después de fraguar las muestras en baño de agua a 37 °C y humedad relativa > 90%, se secaron las muestras a 50 °C durante 24 h. A continuación, se midieron la longitud, el espesor y la altura de cada muestra utilizando un micrómetro. La medida de cada dimensión es la media de tres medidas realizadas en distintos puntos de la muestra. Después de determinar el peso seco de cada muestra, se calculó la densidad aparente utilizando la formula:

$$D_{ap} = M/V \quad (27).$$

dónde, D_{ap} : la densidad aparente (g/mm^3), M: la masa en g y V: el volumen en mm^3

Se determinó la densidad real (D_r) del cemento cálcico utilizando el picnómetro de helio (Accupyc 1330, Micromeritics, Bedfordshire, Reino Unido). El helio es un gas cuya molécula penetra la gran mayoría de los poros del cemento cálcico. Por ello, este gas permite determinar de forma precisa la densidad real del cemento excluyendo la porosidad [199]. El picnómetro tiene una cámara con gas de helio a una presión inicial determinada. Esta presión inicial se disminuye cuando se conecta esta cámara con la cámara (de volumen conocido) que tiene la muestra. Así, el volumen de la muestra se obtuvo de la diferencia entre la presión inicial y final del helio. Este proceso se repitió 10 veces. A partir de estas medidas, el picnómetro calculó la densidad real del cemento de los datos de la masa inicial previamente introducidos.

Se calculó la porosidad relativa (P) del cemento utilizando la ecuación:

$$P \% = 100 * (1 - (D_{ap}/D_r)) \quad (28).$$

Se utilizó la porosimetría de mercurio para el análisis de poros. La técnica determina el volumen de mercurio forzado a entrar en los poros como una función de la presión, la cual está relacionada con el tamaño de poro. Se aplica presión al mercurio de forma progresiva, produciéndose una intrusión gradual del mercurio en el medio poroso evacuado, seguida por la extrusión (es decir la expulsión del mercurio desde la estructura porosa) a medida que la presión va disminuyendo. A baja presión el mercurio solo está forzado a penetrar en canales porosos de gran diámetro de la muestra. Por tanto, el cambio de volumen de mercurio es pequeño. Cuando se aumenta la presión, el mercurio penetra en los poros más pequeños y se produce una gran reducción del volumen de mercurio.

Estudio de la cohesión del cemento cálcico

Se han propuesto distintos métodos para estudiar la cohesión de la pasta del cemento. Andrianjatovo y Lemaitre inyectaron la pasta del cemento en solución Ringer, observaron su estabilidad visualmente y midieron la concentración de los iones de Ca^{2+} liberados del cemento en función del tiempo [200]. Cherng et al estudio la resistencia del COFC a ser quitado por la mano [104]. Fernández et al propusieron tres métodos: La inspección visual, medir el tamaño geométrico del cemento y el uso de la aguja de Gillmore. Los autores concluyeron que el segundo método no era válido [101].

Khairoun et al utilizó la inspección visual para observar la superficie del cemento después de sumergirlo en solución Ringer. El tiempo de cohesión fue definido como el mínimo tiempo necesario para obtener una pasta de cemento estable en una solución [201]. Ishikawa propuso un método cuantitativo dependiendo del peso de fracción de cemento que resistió el envejecimiento en agua destilada durante 24 h [202]. Bohner et al han descrito un método cuantitativo y continuo en el tiempo para estudiar la cohesión. El método se basa en medir el cambio en el peso de la pasta del cemento causado por la sedimentación de partículas pequeñas. [102]

Para realizar este estudio se utilizaron cilindros de polietileno (10 mm X 5 mm) abiertos en solo una cara. Se pesaron los cilindros y las membranas de filtro Millipore y a continuación se enrasaron los cilindros con la pasta del cemento. Se han utilizado tres muestras para realizar este estudio. Al transcurrir un tiempo definido, se sumergieron los cilindros en viales de vidrio con 5 ml de agua bidestilada y se guardaron en baño de agua con agitación (78 rpm) a 37 °C durante 24 h. La cohesión de los cementos se ha evaluado en tres intervalos de tiempo medidos desde el comienzo de la mezcla: 1 y 2 minutos, 50% de FST y FST. A continuación, se sacaron las muestras de los viales y se filtró en vacío el medio incubador utilizando membranas Millipore (Millipore Ibérica S.A, Madrid, España) con un diámetro de poro de 0.10 µm. Se secaron los cilindros y las membranas a 50 y 30 °C, respectivamente, durante 24 h. Después de pesar los cilindros y las membranas, se calculó la pérdida de peso sólido del cemento utilizando la siguiente formula:

$$\text{La pérdida del peso sólido (\%)} = \frac{P_w}{P_w + C_w} \times 100 \quad (29).$$

dónde P_w : el peso del cemento definido como la diferencia entre el peso del cilindro relleno y el peso del cilindro vacío, C_w : el peso del precipitado definido como la diferencia entre el peso seco de la membrana y el peso de la membrana antes de utilizarla.

Envejecimiento del cemento cálcico

Se han utilizado tres muestras cilíndricas del cemento (10 mm X 5 mm) para estudiar la transformación de fase en el COFC. Por ello, se envejecieron los cilindros del cemento

en 5 ml del medio incubador en baño de agua con agitación (78 rpm) a 37 °C. Los medios incubadores utilizados fueron agua bidestilada y tampón fosfato de pH 7.4. Se ha realizado el envejecimiento del cemento en dos modos. Un modo de envejecimiento estático dónde no se renovó el medio incubador durante el tiempo de observación. Mientras en el modo de envejecimiento dinámico se renovó el medio incubador cada 24 h.

Determinación del pH de la pasta del cemento

Para medir el pH de la pasta del cemento se utilizó el electrodo de pH InlabSolid® (Mettler-Toledo, Barcelona, España) conectado a pH-metro MP230 (Mettler-Toledo, Barcelona, España). Se calibró el electrodo de pH utilizando tampones de pH 4, 7 y 14. Se pesó 1 g de la fase sólida del cemento en placa de vidrio y se mezcló durante 30 segundos con la fase líquida en una relación P/L de 2.5 y 3. A continuación se colocó el electrodo de pH en la pasta del cemento. Se realizaron las medidas de pH en modo continuo del pH-metro. Se registró la medida de pH cada 30 segundos durante 6 h.

Determinación de la temperatura de la pasta del cemento

Se midió la temperatura de la pasta del cemento utilizando un termopar. Para ello, se pesaron 3 g del polvo de cemento en un vial de 10 mm y se mezclaron con 1 ml de agua bidestilada durante 30 s. Se colocó la sonda del termopar en el centro de la pasta del cemento y se registró la temperatura cada 30 segundos durante 60 minutos a 37 °C. Se aisló el sistema en una cámara de poliéster

Difracción de rayos X

Se utilizó la técnica de difracción de rayos X para identificar estructuras cristalinas. Este método se basa en el modelo de Bragg que describe la estructura cristalina como un conjunto de planos que reflejan los rayos X. La longitud de onda de los rayos X es del mismo orden de magnitud que la distancia entre planos en el cristal y, así, produce un

patrón único por las interferencias de los rayos reflejados por los distintos planos separados por una distancia d que viene dada por la expresión:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (30).$$

dónde d : la distancia entre planos del cristal, θ : el ángulo de la radiación incidente, n : el orden de la reflexión y λ : la longitud de onda de los rayos X.

Se han utilizado dos técnicas de difracción de rayos X. La difracción de polvo que nos permite identificar las fases cristalinas presentes en una muestra (en forma de polvo) en forma cualitativa y estudiar orientaciones preferenciales.

La otra técnica es la difracción por incidencia rasante (DIR) o de ángulo rasante. Las medidas se realizan con ángulos de incidencia muy pequeños para maximizar la señal de las capas finas. Esto permite la determinación de perfiles de profundidad de las composiciones de fases de las muestras en capas, con lo que puede lograrse la determinación de perfiles de profundidad en función de la composición. Así, la técnica es muy adecuada para estudiar capas finas y recubrimientos.

Para la identificación de fase de los materiales sólidos de partida y el COFC se han empleados dos difractómetros:

- Philips X'pert
- D 5005 (Siemens, Karlsruhe, Alemania)

Ambos difractómetros están operados a 40 kV y 40 mA. La radiación empleada fue $\text{CuK}\alpha$. Los diagramas de difracción de rayos X fueron registrados en intervalo $2\theta = 10$ - 80° con tamaño de paso = 0.03° y la velocidad de barrido angular para 3 s/paso. Los diagramas fueron también registrados en las condiciones de un intervalo de $2\theta = 20$ - 40° , un paso de 0.02° y velocidad de barrido angular de 1 s/paso. Se emplearon los siguientes modelos estructurales del Internacional Centre for Structural Data (ICSD): DCPD (ICSD 016132) [203], β -TCP (ICSD 06191) [204] y DCPA (ICSD 38128) [205]. Se realizó la cuantificación de las distintas fases mediante el análisis de refinamiento de Rietveld.

Espectroscopia de Infrarrojos

La espectroscopia de infrarrojos sirve para estudiar las vibraciones de los átomos de una molécula. Al irradiar la molécula con infrarrojos, la molécula absorbe una parte de la radiación en unas longitudes de onda específicas lo que provoca vibraciones de excitación en la molécula. Distintas moléculas absorben distintas longitudes de onda de la radiación, lo que se expresa en un espectro de absorción muy característico para una molécula específica.

Se pulverizaron las muestras en mortero de ágata con mano y se mezclaron con bromuro potásico (KBr) en relación de 250 mg (bromuro potásico): 5 mg (muestra). Se prepararon los discos translucidos utilizando una presión hidráulica y un troquel cilíndrico de 13 mm de diámetro. La transformada de Fourier de los espectros infrarrojos se registró en transmisión en el rango 4000-400 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} utilizando Perkin-Elmer 1720. Se utilizó como fondo la señal de un disco translucido de KBr.

Microscopia electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos con alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$). Básicamente, en el SEM un haz de electrones incide (electrones primarios) sobre la superficie de una muestra, produciéndose la emisión de electrones secundarios por la dispersión inelástica entre el haz de electrones incidentes y los electrones de los átomos de la superficie de la muestra. Estas emisiones serán captadas por detectores sensibles a los electrones y convertidas en una imagen. Un mapeo (barrido) de la superficie de la muestra es posible moviendo el haz de electrones primarios sobre la superficie.

Las imágenes de SEM se realizaron sobre las muestras rotas que fueron utilizadas para estudiar las propiedades mecánicas. Después de secar las muestras a 50 °C durante 24 h, se montaron en porta muestras de cobre utilizando una cinta de grafito. Se recubrieron las muestras con oro mediante deposición de vapor. Se registraron imágenes de la superficie de ruptura utilizando SEM (JSM6400).

Cemento como soporte para cultivos celulares

Se prepararon las muestras de cementos en las que se cultivó la línea celular humana hFOB1.19 según el protocolo siguiente: Se lavaron las muestras 2 veces con tampón fosfato (PBS) y se fijaron utilizando glutaraldehído 2% durante 30 minutos. A continuación se secaron en una serie de concentraciones de acetona de 15, 30, 50, 70, 90 y 100% a 4 °C con 10-15 minutos por cada paso. Se incubaron las muestras en 100% acetona. Se secaron en punto crítico y se fijaron en porta muestras de cobre mediante un adhesivo de carbono. Finalmente, se cubrieron las muestras con oro en vacío y se estudiaron en SEM.

Determinación del tamaño de partículas

Las medidas de tamaño de partículas se realizaron en analizador de tamaño de partícula por dispersión de luz láser, Malvern Mastersizer X (Malvern instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). La técnica opera bajo la predicción del comportamiento de las partículas sobre la dispersión de luz. Las partículas dispersan luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad que es dependiente de su tamaño. La luz dispersada tendrá diferentes intensidades según el ángulo de observación. De una forma simple, diremos que, las partículas pequeñas dispersan luz a grandes ángulos, mientras que las partículas grandes dispersan luz a pequeños ángulos. Si un conjunto o grupo de partículas suspendidas en aire o en cualquier otro medio transparente, como el agua o un solvente, es travesado por un haz de láser, cada partícula dispersará luz frontalmente a un ángulo inversamente proporcional a su tamaño. El principio básico considerado en los analizadores de tamaño de partículas por difracción láser es que, con ciertos límites, el patrón de dispersión creado por este conjunto de partículas es idéntico a la suma de los patrones de dispersión individuales de todas las partículas presentes. Así, con el conocimiento de la disposición geométrica de los detectores de un instrumento y de la fuente de luz, junto con los datos que representan las intensidades relativas de la luz dispersada recibida sobre cada elemento detector del conjunto de todos los detectores, es posible calcular la distribución de tamaño de partículas. Esta simple interdependencia de la intensidad de la dispersión, de la distribución angular de la luz dispersada y del tamaño de la partícula, alcanza su límite cuando el diámetro de las partículas está

próximo a la longitud de onda de la fuente de luz usada. En éste punto, los efectos adicionales de interferencia producidos no pueden ser ignorados y se aplican una serie de aproximaciones.

Las medidas se realizaron con onda de haz láser fija a 690 nm y se utilizaron las lentes de 45 mm, 100 mm y 300 mm necesarias para medir partículas de diámetro entre 0.1-300 μm . La preparación de muestras se realizó dispersandolas en isopropanol anhidro en un baño de ultrasónico durante 3 minutos. El tamaño medio de la muestra es una media de 5 medidas.

Determinación de potencial Z

Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad de un coloide cargado y para explicar como actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. La atracción de un coloide con carga negativa hace que algunos iones positivos (contra-iones) formen una capa rígida alrededor del coloide. Esta capa de contra-iones se llama la capa de Stern. Otros iones atraídos por el coloide negativo serán ahora rechazados tanto por la capa Stern como por otros iones positivos que intenten acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de la capa difusa de contra-iones. La concentración de los contra-iones disminuye gradualmente al alejarse del coloide hasta que se logren su equilibrio en el seno de la disolución. Mientras, la concentración de los co-iones aumenta gradualmente al alejarse del coloide hasta que se logren su equilibrio en el seno de la disolución. Los contra-iones en la capa Stern y la capa difusa es lo que llamamos la doble capa.

El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. Un punto de particular interés es el potencial dónde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

La determinación de potencial Z de las partículas se realizó en el equipo Malvern Mastersizer X (Malvern instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido). Se dispersó la muestra en agua utilizando un baño ultrasónico durante 3 minutos. El potencial Z de la muestra se obtuvo como una media de 5 medidas.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que permite determinar cambios de fase utilizando dos termopares conectados a un voltímetro. Uno de los termopares está en contacto con la muestra a estudiar, y el otro está en contacto con un material inerte como la alúmina. Al incrementar la temperatura, habrá cambios en el voltaje debido a las diferencias entre el comportamiento de la alúmina y de la muestra en estudio. De esta forma se obtienen curvas de (voltaje/masa de la muestra), en función de la temperatura, que indican los cambios de fase del material analizado.

Se realizaron las medidas utilizando DSC820 (Mettler-Toledo, Barcelona, España) equipado con un refrigerador (Intracooler, Mettler-Toledo, Barcelona, España). Se pulverizó la muestra de cemento fraguado en mortero de ágata con mano. Se pesaron 5 mg de la muestra en crisoles de Pt-Ir para su análisis. Se realizó el análisis térmico en un rango de 50-500 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Espectroscopia de masas con fuente de plasma acoplado por inducción

La ionización mediante plasma de acoplamiento inductivo se utiliza normalmente para el análisis elemental de metales en soluciones acuosas. Este plasma se consigue sometiendo un flujo de un gas, generalmente argón, a la acción de un campo magnético oscilante, el cual es inducido por una corriente de alta frecuencia. Al entrar en contacto con el plasma las moléculas de la muestra se excitan o se ionizan formándose los iones que saldrán de la fuente ICP y se dirigirán al analizador de masas por el efecto del gradiente de vacío. Esta técnica permite trabajar con límites de detección muy bajos, del orden de ppt (parte por trillón), y también ofrece excelentes resultados cuantitativos.

La técnica se utilizó para medir las concentraciones de los iones de Sr^{2+} y Ca^{2+} , utilizando un ICP-MS (ICP-MS, Varian, Darmstadt, Alemania), en función de soluciones de estándar de 50 y 100 ppb (parte por billón) (Sr^{2+}), y 5000 y 10000 ppb (Ca^{2+}) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Radiopacidad de COFC

Se utilizó una pieza de aluminio con unas escalas con un paso de 0.5 mm. Se prepararon cilindros de COFC relleno de la pasta del cemento en moldes de silicona de 8 mm en diámetro y 4 mm en espesor. Se realizó una radiografía colocando las muestras en línea, paralelamente a la pieza de aluminio.

Prueba de biocompatibilidad

Se cultivaron las células de la línea celular humana hFOB1.19 en el medio de cultivo DMEM/NUT MIX F-12 (HAM, Invitrogen Life Technologies) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina y 1% estreptomicina (Invitrogen Life Technologies) en una incubadora a 5% CO_2 y 37 °C.

Se prepararon cilindros de COFC (0.8 mm de diámetro y 3 mm de espesor) utilizando β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP y 33.3%-Sr- β -TCP en moldes de silicona. Se lavaron los cilindros de COFC en agua destilada. Este proceso se repitió hasta conseguir un pH estable del agua después de lavar las muestras. Se secaron las muestras a temperatura ambiente. Se realizó la esterilización de las muestras en 70% etanol durante 60 minutos. Se colocaron las muestras por triplicado en placa de 24 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania). A continuación, se sembraron las células con una densidad inicial de 50 000 células por pozo. La poliesterina sirvió como control positivo.

La proliferación y la viabilidad celular se evaluaron después de 3, 5, 7 y 10 días de cultivo. Se midió la proliferación celular vía recuento celular electrónico utilizando el analizador celular CASY 1 TTC (Schärfe System, Reutlingen, Alemania). Para ello, se lavaron las células dos veces en PBS y se despegaron de la superficie de la muestra mediante la incubación con 1 ml de acetasa (PAA, Cölbe, Alemania) a 37 °C durante 7 minutos. La reacción enzimática se neutralizó añadiendo igual cantidad de DMEM. Después de mezclar bien la suspensión celular, se diluyó (1:100) en 10 ml Isoton III (Beckmann Coulter, Krefeld) y se recontaron las células. El número de las células fue

determinado automáticamente con Casy-state software (Schärfe System, Reutlingen, Alemania). La viabilidad celular fue evaluada utilizando el reactivo de proliferación celular WST 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se incubaron las células con el reactivo WST en relación 1: 100 durante 30 minutos en la incubadora a 37 °C. A continuación se midió la adsorción del sobrenadante utilizando el lector de placas Tescan spectra fluor plus (Tecan, Crailsheim, Alemania). Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados fueron representados (media \pm SD). Se realizó el análisis estadístico utilizando el análisis de variancia de dos factores (origen 7.1). A posteriori, se realizaron las pruebas de comparación múltiple utilizando la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Ensayos *in vivo*

Implantación de COFC

Antes de comenzar el estudio animal *in vivo* el protocolo fue aprobado por el Comité Ético para experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Los experimentos se realizaron de acuerdo a la normativa europea de 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC) y se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y malestar de los animales.

Se ensayaron los cementos *in vivo* en forma granulada. Para preparar el granulado del COFC: se pesaron 5 g de la fase sólida del cemento y se mezcló con la fase líquida en placa de vidrio durante 30 segundos. Después de fraguarse en baño de agua a 37 °C y humedad relativa > 90% durante 30 minutos, se molió el cemento en mortero de vidrio con mano para obtener gránulos que se separaron con tamices que tenían un diámetro de poro entre 0.2-2mm. Para los ensayos *in vivo* se utilizaron los gránulos de diámetro de 0.2-0.8mm. La preparación de las muestras se ha realizado en condiciones asépticas. Se esterilizaron las muestras en 70% etanol durante 60 minutos. A continuación se secaron las muestras debajo de una campana de flujo a temperatura ambiente.

Para evaluar el efecto *in vivo* de la incorporación del C4S en cemento de brushita fraguado con ácido glicólico, se realizaron pruebas en un grupo de 7 conejos New Zealand con más de 6 meses de edad sanas y con peso entre 3.9 y 4.4 kg. La

investigación fue realizada en un modelo de cámara de titanio (10 mm de diámetro) en calota de conejo. De este modo se valora la capacidad regenerativa de un biomaterial al excluir la capacidad autoregenerativa del organismo. En este estudio se evaluó la capacidad regenerativa que tenían los cementos en una fase intermedia de maduración ósea (8 semanas).

Los animales fueron acomodados en el animalario oficial para ensayos animales de la UCM a 22-24 °C, con una humedad relativa de 55-70 %, ciclos de luz de 12 horas y renovación del aire 15 veces por hora. Los animales fueron alimentados con una dieta Panlab SL de mantenimiento y agua ad libitum.

Los conejos fueron anestesiados con una dosis de 0,75 mg/kg de ketamine (Imalgene 1000) y 0,25 mg/kg de xilacine (Rompun) y se colocaron en posición de decúbito supino, con la cabeza afeitada. La superficie cutánea fue desinfectada con una solución de povidona yodada previo a la operación quirúrgica. A continuación se realizó una incisión de aproximadamente 6 cm de largo sobre la línea media para exponer la superficie ósea de la calota. La piel fue elevada con un par de pinzas para hacer una incisión en el periostio similar a la de la piel. Se separó el periostio de la superficie ósea con un periostótomo (Figura 1).

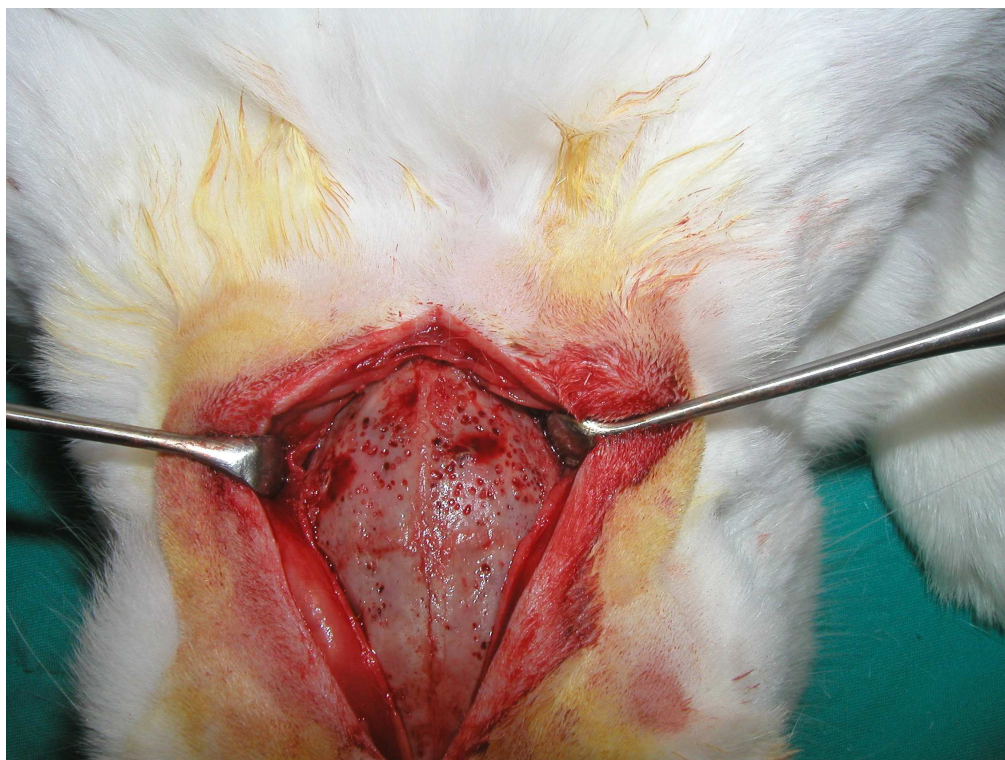


Figura 1. Superficie ósea de calota de conejo expuesta para colcar los cilindros de titanio.

En el modelo de la cámara de titanio, se preparó mediante una trefina de 10 mm de diámetro (Figura 2) un surco circunferencial en ambos huesos parietales para estabilizar los cilindros de titanio, uno a cada lado de la sutura media sagital (Figura 3). Tras realizar el surco, se efectúa decorticación con fresa redonda para eliminar la capa más superficial de la cortical y favorecer la regeneración (Figura 4). Se rellenó la cámara derecha con gránulos de cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico y la cámara izquierda con gránulos de cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico modificado con 2% C4S.

El periostio y los tejidos subcutáneos fueron suturados de manera rutinaria con hilos de sutura reabsorbibles (dexon®3/0) mediante puntos sueltos (Figura 5), mientras que la piel fue suturada con hilo de seda (3/0) (Apositos Sanitarios Aragoneses) (Figura 6).

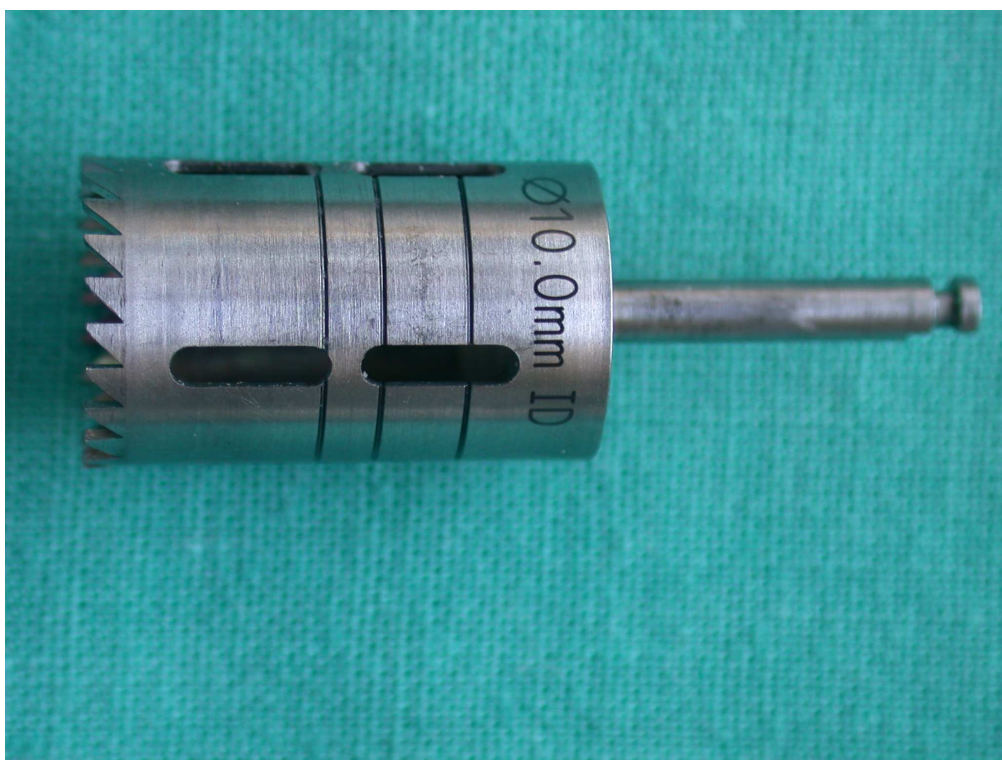


Figura 2. Trefina de 10 mm de diámetro para crear surco circunferencial en el hueso parietal.

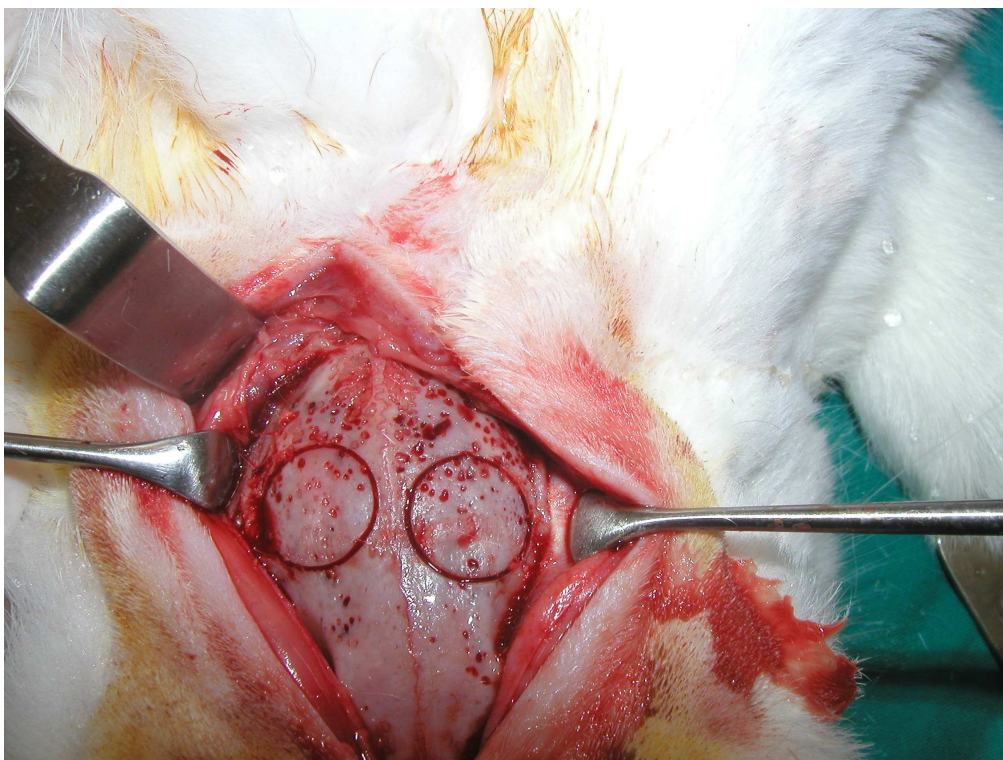


Figura 3. Surco circunferencial en ambos hueso parietales para establecer los cilindros de titanio.

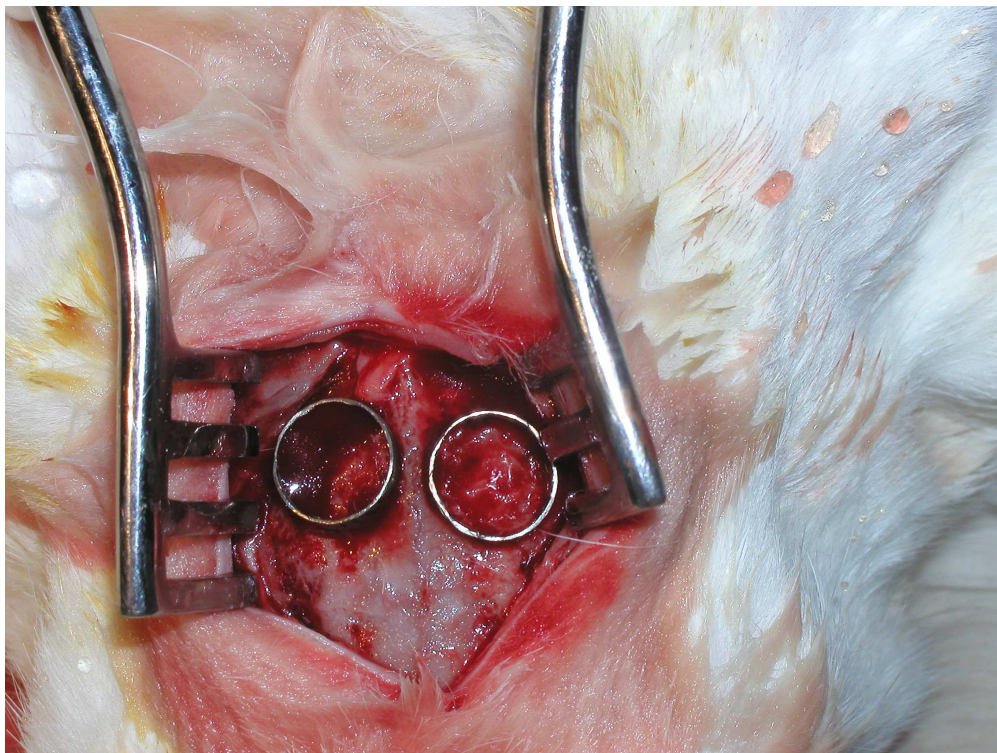


Figura 4. Colcación de los cilindros de titanio después de decorticar la capa más superficial del hueso parietal.



Figura 5. Suturar el periostio y los tejidos subcutáneos con hilos de sutura reabsorbibles mediante puntos sueltos.



Figura 6. Suturar la piel con hilo de seda (3/0).

Como profilaxis post operatoria para infecciones e inflamaciones, se administró a los conejos en el agua de beber Terramicina® durante 7 días. Los animales fueron sacrificados después de 8 semanas de la intervención con una sobredosis de pentobarbital sodio IV (Dolethal; Vetoquinol). Tras el sacrificio se empleó una fresa quirúrgica adaptada a una pieza de mano eléctrica lenta para extraer los bloques de hueso que contenían los defectos de las calotas de los animales. Las muestras se fijaron en 20% formaldehído (pH 7.4).

Análisis histológico

Para el estudio histológico, las muestras de hueso fueron deshidratadas en series ascendentes de alcohol (50-100 %) y embebidas en 2-hidroxietil-metacrilato según el método de Donath y Breuner [206]. Para ello, se utilizó un monómero de metacrilato que se ha sustituido gradualmente por un polímero de metacrilato que permite su endurecimiento por fotopolimerización con luz ultravioleta, durante dos horas con luz blanca y seis con luz azul. Con los bloques así obtenidos, se efectuarán distintos cortes de 50-80 micras para su estudio con microscopía óptica. Tras el corte se procede a la tinción histológica con Azul de Toluidina (AT) para realizar el estudio histológico que permita evaluar las diferencias de calidad entre el grupo experimental y el control.

Para los análisis histomorfométricos se capturaron las micrografías ópticas de las secciones de las biopsias con una cámara digital JVC TK C1380 (JVC Victor Co., Tokyo, Japón) para luego ser analizadas con el software histomorfométrico IAS 2000 (Delta Sistemi, Roma, Italia). Se realizaron las siguientes mediciones para cada defecto: volumen total de la muestra, volumen de hueso neoformado y volumen de injerto remanente. Estos datos permitieron calcular los siguientes parámetros; la media del volumen de hueso neoformado en los defectos (BV), la media del volumen de injerto remanente (RG) y la media del volumen de tejidos mineralizados aumentados (AMV).

$$\text{Porcentaje de hueso neoformado (BV)} = \frac{\text{Área de hueso neoformado}}{\text{Área inicial del defecto}} \times 100 \quad (31).$$

$$\text{Porcentaje de injerto remanente (RG)} = \frac{\text{Área inicial del defecto}}{\text{Área de injerto remanente}} \times 100 \quad (32).$$

Análisis estadístico

Para el análisis histomorfométrico se utilizó el programa informático Statgraphics 5.0 y el tratamiento estadístico de los resultados se realizaron con el test de Wilcoxon. La significación estadística fue determinada para una $p < 0.05$.

8. Resultados y discusión

8.1 Cohesión de COFC de brushita

Los ácidos carboxílicos se han utilizado como retardantes de la reacción de fraguado del cemento de brushita ya que esta reacción es muy rápida. En este trabajo, investigamos el efecto de unos ácidos carboxílicos (cítrico, glicólico y tartárico) en las propiedades químico-físicas del cemento de brushita y en su cohesión. El ácido hialurónico y el chondroitin 4 sulfato (C4S) se han utilizado para mejorar la inyectabilidad de un cemento de brushita (chronOsTM Inject, Synthes-Norian) y un cemento de apatita (Biopex[®], Mitsubishi materials), respectivamente. Por esta razón, hemos estudiado también como influye la incorporación de estos dos polisacáridos en la fase líquida del cemento de brushita en sus propiedades químico-físicas y su cohesión.

8.1.1 Resultados

Tiempo de fraguado final de los cementos de brushita

Se han realizado medidas del tiempo de fraguado final de los cementos a temperatura ambiente (20-23 °C) y humedad relativa entre 55-60%. Los resultados se encuentran en la figura 1. El cemento de brushita preparado con ácido fosforico fraguó en 1.5 minutos mientras que el uso de los ácidos carboxílicos aumentó el tiempo de fraguado final hasta 3.8, 7 y 16.6 minutos para los cementos preparados con 0.5M ácido tartárico, 1M ácido glicólico y 0.5M ácido cítrico, respectivamente. Sin embargo, la modificación de la solución acuosa de 0.5M ácido cítrico añadiendo 0.5% (peso/peso) C4S y el ácido hialurónico no afectó significativamente el tiempo de fraguado del cemento de brushita en comparación con el tiempo de fraguado del cemento preparado con 0.5M ácido cítrico.

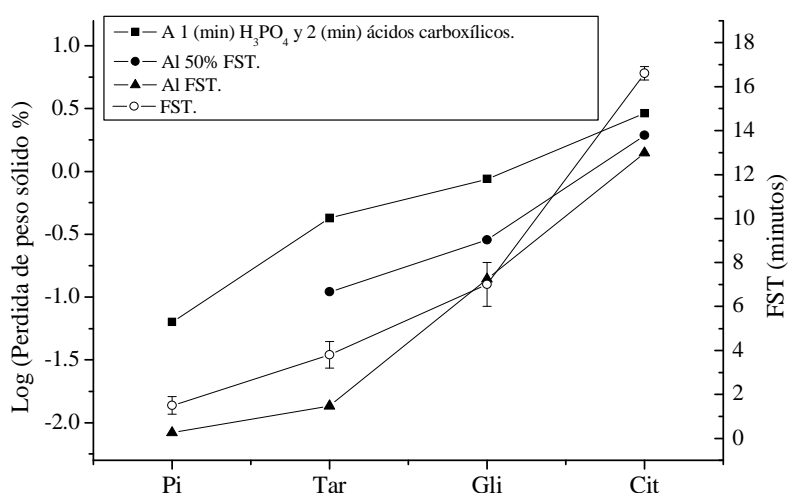


Figura.1 Tiempo de fraguado final (temperatura ambiente) y pérdida de peso sólido de los cementos de brushita fraguados con 2M ácido fosforico (Pi), 0.5M ácido tartárico (Tar), 1M ácido glicólico (Gli) y 0.5M ácido cítrico (Cit) después de 24 h de incubación en H_2O . Los cementos fueron incubados después de: 1 minuto para el ácido fosforico y 2 minutos para los ácidos orgánicos, mitad del FST y FST

Fuerza de tensión diametral

La fuerza de tensión diametral (DTS) del cemento de brushita depende de la fase líquida usada en la preparación del cemento. El cemento fraguado con 0.5M ácido cítrico tuvo la mayor DTS seguido por los cementos fraguados con 1M ácido glicólico y 0.5M ácido tartárico. El cemento fraguado con el ácido fosforico obtuvo la menor DTS (Figura 2). Esta tendencia es paralela al aumento del tiempo de fraguado final de los cementos de brushita (Figura 1).

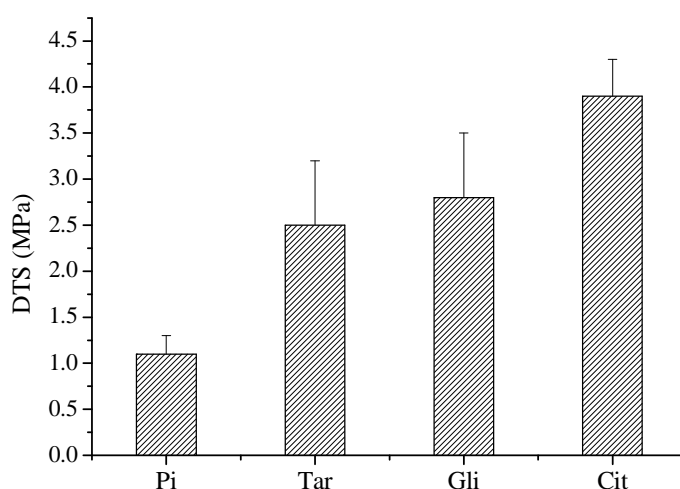


Figura 2. Fuerza de tensión diametral de los cementos de brushita fraguados con 2M ácido fosforico (Pi), 0.5M ácido tartárico (Tar), 1M ácido glicólico (Gli) y 0.5M ácido cítrico (Cit) después de la incubación en agua bidestilada durante 24 h.

Desintegración del COFC de brushita

Se ha realizado el estudio utilizando volúmenes iguales del medio de incubación (agua bidestilada) para evitar diferencias en la pérdida de peso asociada a la saturación del medio con iones de calcio [123 y 136]. La figura 1 muestra la desintegración superficial de los cementos de brushita en función de la fase líquida utilizada en su preparación. El tiempo cero de referencia para incubar las muestras del COFC fue el momento de mezclar las dos fases del cemento. Las muestras preparadas con los ácidos carboxílicos fueron incubadas después de 2 minutos, 50% del FST y el FST. Mientras que la muestras preparadas con ácido fosforico fueron incubadas después de 1 minuto y del FST.

La desintegración del cemento fue medida por la pérdida de peso sólido según la formula 29. Los resultados muestran que la perdida de peso sólido fue mínima cuando el cemento se fraguó con el ácido fosforico (Figura 1). Por lo contrario, el cemento fraguado con el ácido cítrico presentó la máxima perdida de peso sólido. El cemento fraguado con ácido tartárico mostró menos desintegración superficial que el cemento fraguado con ácido glicólico. La perdida de peso sólido fue mayor a tiempo de incubación mas corto. La desintegración del cemento fraguado con ácido cítrico fue *ca.* 3% a 2 minutos del comienzo de la mezcla. Sin embargo, la desintegración desminuyó a *ca.* 1.4% cuando se incubó al FST (Figura 1).

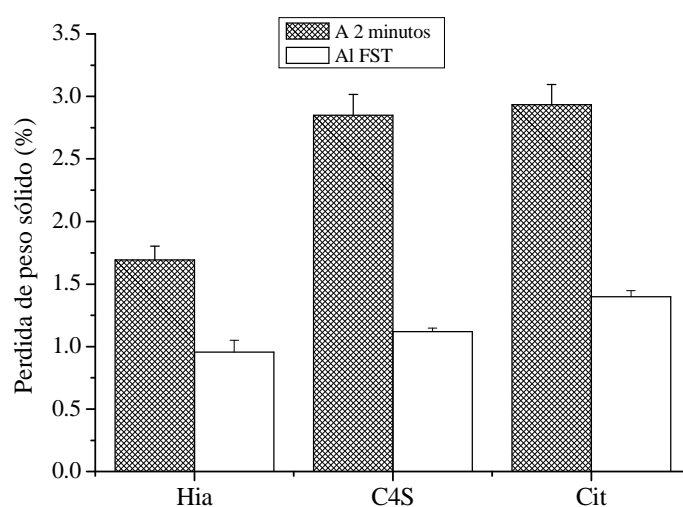


Figura 3. Perdida de peso sólido de los cementos de brushita fraguados con 0.5% (peso/volumen) ácido hialurónico-0.5M ácido cítrico (Hia) y 0.5% chondroitin 4 sulfato-0.5M ácido cítrico (C4S) y 0.5M ácido cítrico (Cit) después de 24 h de incubación en H₂O.

La adición del C4S al 0.5% (peso/volumen) no modificó significativamente la viscosidad de la solución acuosa de 0.5M ácido cítrico. Sin embargo, el ácido hialurónico al 0.5% (peso/peso) aumentó significativamente la viscosidad del 0.5M ácido cítrico (Tabla 1). Cuando se incubaron las muestras a 2 minutos después de la mezcla del polvo y el líquido, la desintegración superficial del cemento de brushita fraguado con 0.5% (peso/volumen) ácido hialurónico-0.5M ácido cítrico se redujo en 43%. Por el contrario, el uso del 0.5% (peso/volumen) del chondroitin 4 sulfato-0.5M ácido cítrico no ha mejorado significativamente la cohesión del cemento incubado después de 2 minutos de la mezcla (Figura 3). Sin embargo, la mejora de la cohesión

obtenida con el ácido hialurónico disminuyó al 31.9% cuando las muestras se incubaron al tiempo de fraguado final. El uso del C4S mejoró la cohesión del cemento incubado al FST.

Tamaño y potencial zeta de las partículas desintegradas de la superficie del cemento

El diámetro [100] y el potencial zeta de la superficie de las partículas [207] son factores determinantes para la tolerancia biológica del material liberado. Se ha reportado que valores bajos del potencial zeta favorece la adhesión de los osteoblastos [208]. Las medidas del tamaño y potencial zeta de las partículas no muestran diferencias significativas, dentro del error experimental, entre las partículas desintegradas de la superficie de los cementos de brushita fraguados con los ácidos carboxílicos (Tabla 1). Los diámetros de las partículas cubrieron un rango entre 2.2 y 3.0 μm mientras los potenciales zeta variaron entre -8.5 y -10.5 mV. Así, los valores pequeños del potencial zeta de las partículas desintegradas de la superficie del cemento permiten la anticipación de la adhesión con los osteoblastos [207], sin embargo, los diámetros pequeños de las partículas apuntan hacia un efecto dañino en los osteoblastos [100].

Tabla 1. Viscosidad de la fase líquida del cemento de brushita, diámetro, y potencial zeta (ζ) de las partículas desintegradas del cemento al medio de incubación.

Fase líquida	Viscosidad (mPa.s)	Diámetro \pm SD (μm)	Potencial Z \pm SD (mV)
0.5M ácido cítrico	3.1 ± 0.4	2.7 ± 0.4	-8.8 ± 0.4
1M ácido glicólico	4.1 ± 0.7	2.6 ± 0.7	-8.5 ± 0.6
0.5M ácido tartárico	8.4 ± 0.1	2.2 ± 0.4	-10.5 ± 0.9
0.5M ácido cítrico con 0.5% ácido hialurónico	17.3 ± 0.5	2.7 ± 0.2	-10.4 ± 0.2
0.5M ácido cítrico con 0.5% C4S	2 ± 1	3.0 ± 0.4	-9.9 ± 0.6

Análisis estructural

Se estudió la estructura de los cementos y las partículas desintegradas de su superficie con las técnicas de difracción de rayos X, FTIR y microscopia electrónica de barrido. El análisis de la superficie de rotura de los cementos de brushita fraguados con ácido

cítrico, ácido glicólico y ácido tartraico ha revelado que los cristales del cemento tienen tres formas; prismática, en placa y redonda (Figuras 4,5 y 6).

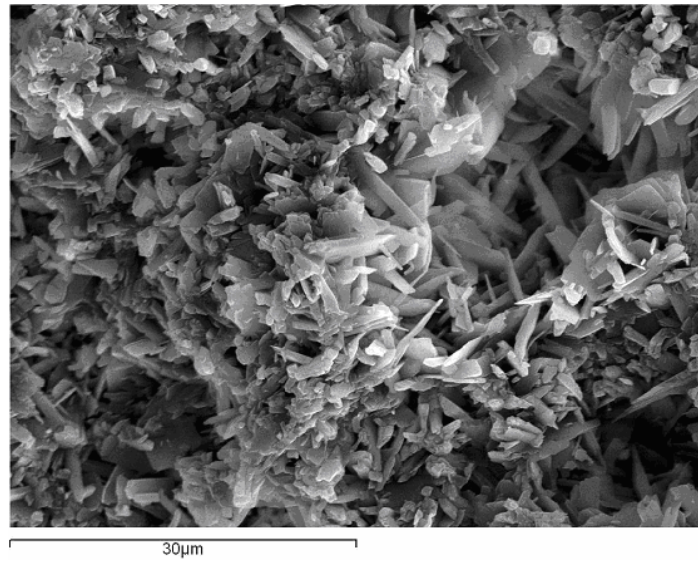


Figura 4. Imagen SEM de la superficie de rotura del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido cítrico (2000X).

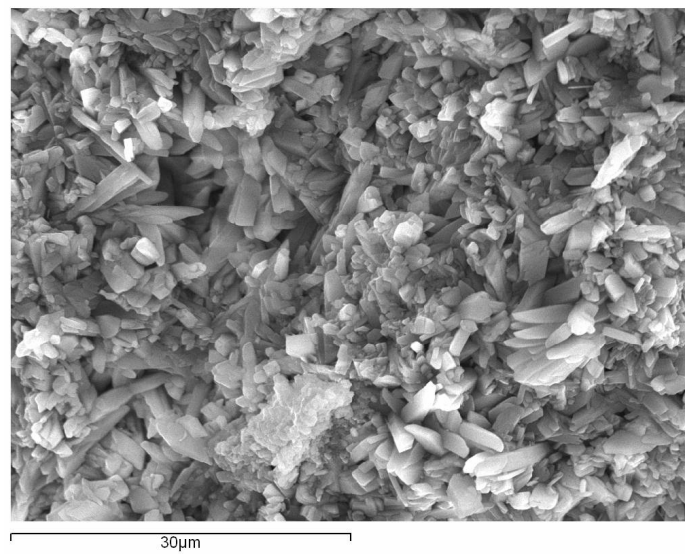


Figura 5. Imagen SEM de la superficie de rotura del cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico (2000X).

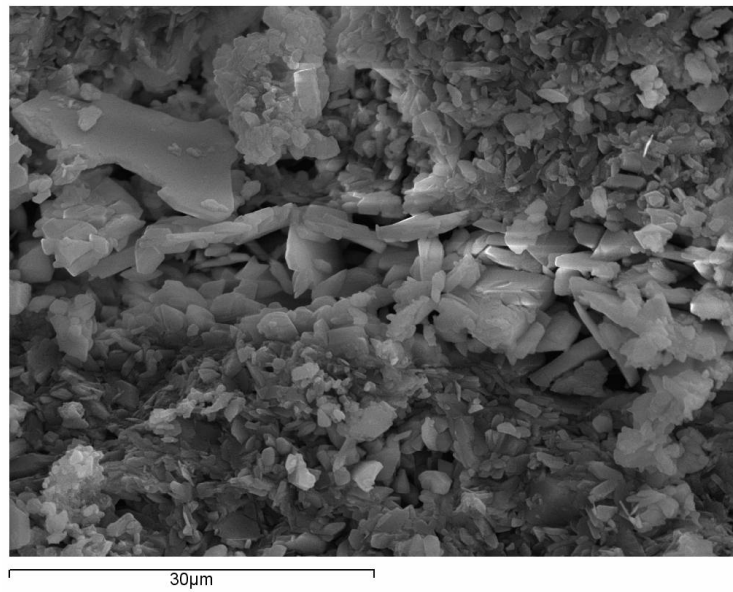


Figura 6. Imagen SEM de la superficie de rotura del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido tartárico (2000X).

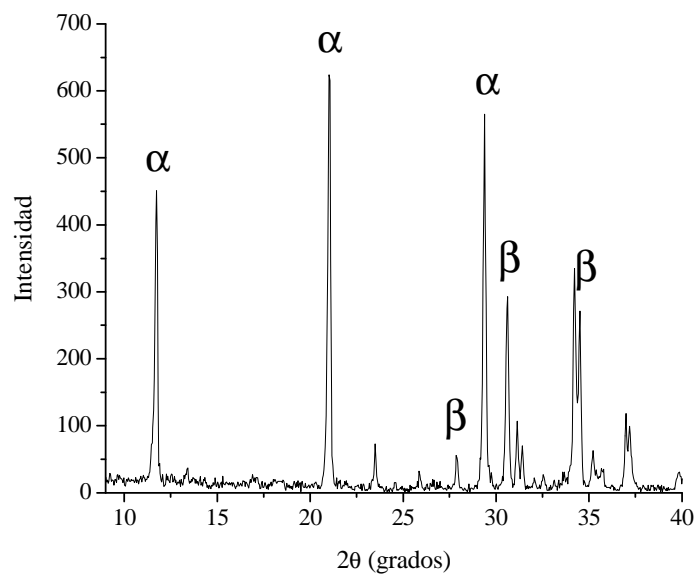


Figura 7. Diagrama de difracción de rayos X del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido cítrico. α y β corresponden a los picos característicos de brushita y fosfato tricálcico- β , respectivamente.

La microestructura de estas muestras se investiga con difracción de rayos X. Los picos con mayor intensidad en el diagrama de difracción del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido cítrico correspondieron a valores 2θ de 11.6, 21, 29.2, 30.6, 31, 34.1 y 34.3 grados (Figura 7). De acuerdo con los patrones de referencia ICSD [203 y 204], la matriz del cemento consta principalmente de brushita y residuos de fosfato tricálcico- β no reaccionado.

Sin embargo, en el diagrama de DRX del cemento cálcico fraguado con 2M ácido fosforico aparecieron después de la incubación en agua durante 24 h nuevos picos a valores 2θ de 26.36, 26.59, 30.07, 30.19 grados (Figura 8). De acuerdo con el patrón de referencia ICSD [205], estos picos corresponden a monetita que forma parte de la matriz del cemento cálcico. Los valores de pH bajos y la humedad favorecen la transformación de brushita a monetita. Así, la presencia de monetita en la matriz del cemento fraguado con 2M ácido fosforico es el resultado del exceso de acidez en el sistema [124].

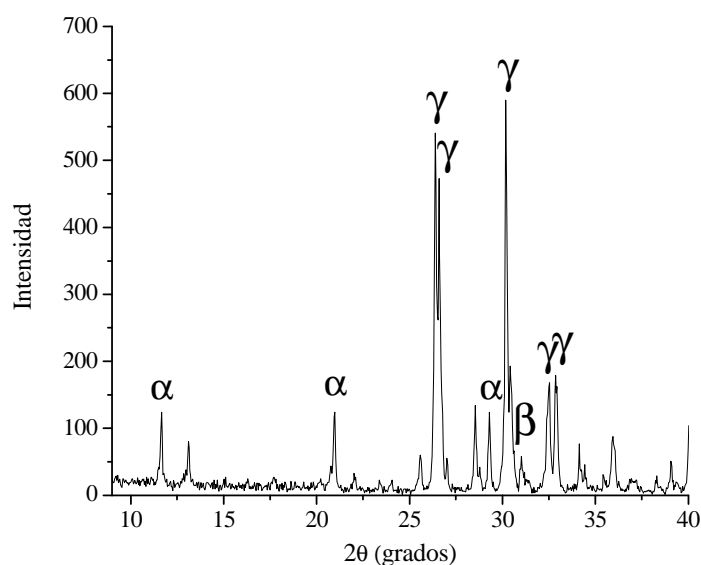


Figura 8. Diagrama de difracción de rayos X del cemento de brushita fraguado con 2M ácido fosforico después de 24 h de la incubación. α , β y γ corresponden a los picos característicos de brushita, fosfato tricálcico- β y monetita, respectivamente.

Se utilizó la técnica FTIR para desvelar cambios estructurales inducidos en los cementos de brushita tras su incubación en agua. En la figura 9 se muestran los espectros FTIR para los cementos de brushita antes y después de su incubación.

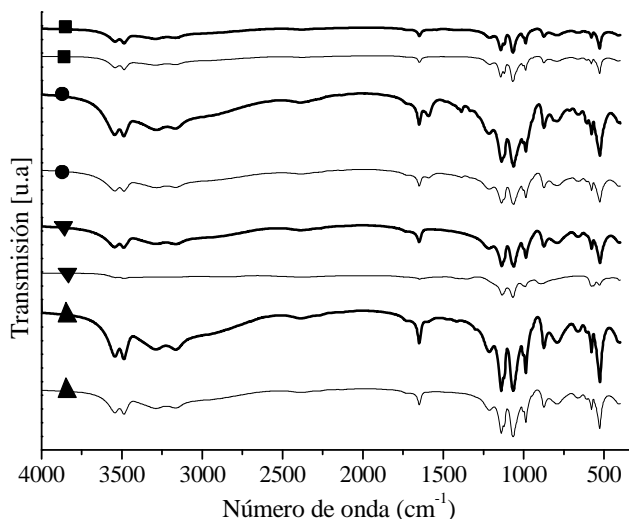


Figura 9. Espectros FTIR de cementos de brushita antes (línea gruesa) y después (línea fina) de la incubación en agua durante 24 h. Cementos de brushita fraguados con: ácido cítrico (■), ácido tartárico (●), ácido fosforico (▼) y ácido glicólico (▲).

Se puede observar la presencia de bandas de vibración a números de onda 1589 cm^{-1} y 1385 cm^{-1} correspondiendo a las vibraciones simétricas y asimétricas del grupo carboxílico. Tal como se muestra en la figura 10, estas dos bandas desaparecieron de los espectros de los cementos fraguados con 0.5M ácido cítrico y 1M ácido glicólico después de la incubación en agua durante 24 h.

Sin embargo, las bandas de vibración correspondientes al grupo carboxílico están presentes en los espectros FTIR de los cementos fraguados con 0.5M ácido tartárico antes y después de la incubación en agua (Figura 11). Estas diferencias de comportamiento de los cementos fraguados con los distintos ácidos son debidas a que la solubilidad en agua del complejo de carboxilato cálcico sigue la secuencia: ácido tartárico < ácido glicólico < ácido cítrico.

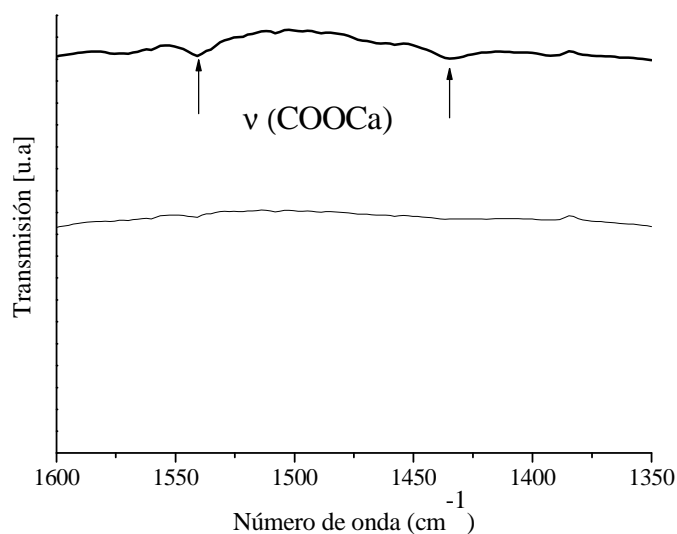


Figura 10. Espectros FTIR del cemento de brushita fraguado con ácido cítrico antes y después de la incubación en agua durante 24 h mostrando la ausencia de las bandas de vibración del complejo de carboxilato cálcico después de la incubación (línea fina).

La ausencia de las bandas de vibración del grupo hidroxilo (OH^{1-}) y las del H_2O en el espectro de FTIR del cemento fraguado con 2M ácido fosforico indicó la presencia de monetita en la matriz del cemento (Figura 9).

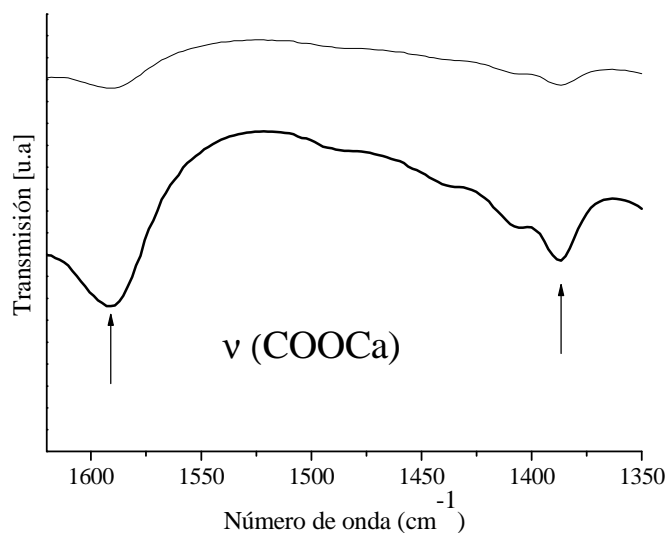


Figura 11. Espectros FTIR del cemento de brushita fraguado con ácido tartárico mostrando la presencia de las bandas de vibración del complejo de carboxilato cálcico antes (línea gruesa) y después (línea fina) de la incubación en agua durante 24 h.

La ausencia de diferencias en los espectros FTIR de los cementos de brushita fraguado con 0.5M ácido cítrico modificado con 0.5% (peso/volumen) del chondroitin 4 sulfato y ácido hialurónico que su incorporación no afectó la composición de los cementos de brushita tal como se muestra en la figura 12.

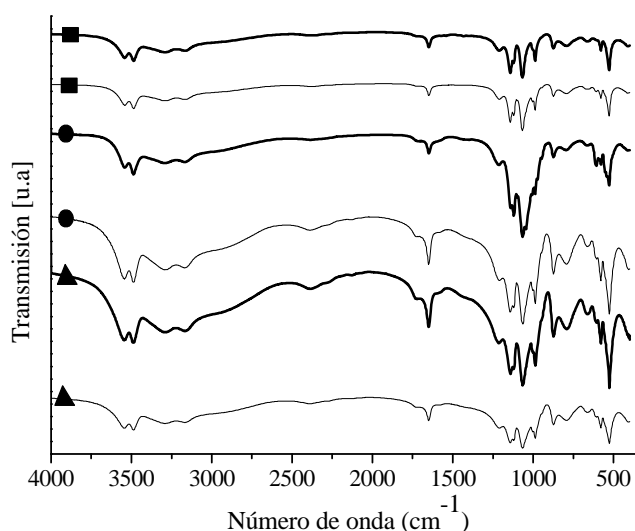


Figura 12. Espectros FTIR de cementos de brushita antes (línea gruesa) y después (línea fina) de la incubación en agua durante 24 h. Cementos de brushita fraguados con: ácido cítrico (■), 0.5% (peso/volumen) chondroitin 4 sulfato-0.5M ácido cítrico (●) y 0.5% (peso/volumen) ácido hialurónico-0.5M ácido cítrico (▲).

Se estudió la composición de las partículas liberadas durante la incubación del cemento para ver si la desintegración ocurría con preferencia en alguna fase o era uniforme. Los espectros de las partículas desintegradas de la superficie de los cementos fueron muy similares. Las bandas de vibración aparecieron a números de onda de 554, 606, 945, 971, 1041, 1097 y 1119 cm^{-1} (Figura 13). Estos espectros son similares a los espectros FTIR para hidroxiapatita y fosfato tricálcico- β [209 y 210]. La banda de vibración ν_3 del grupo PO_4^{3-} aparece a número de onda de 1087 cm^{-1} en hidroxiapatita y a 1120 cm^{-1} en el espectro del fosfato tricálcico- β [209]. Así, se puede concluir que las partículas desintegradas del cemento están formadas fundamentalmente por fosfato tricálcico- β .

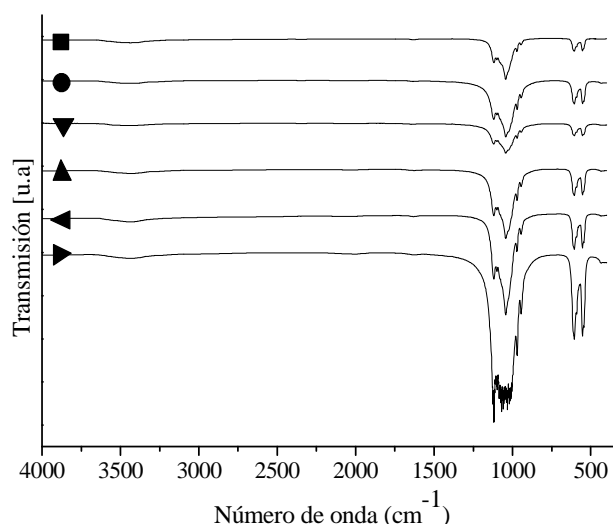


Figura 13. Espectros FTIR de las partículas desintegradas de la superficie del cemento de brushita fraguado con: ácido cítrico (■), ácido tartárico (●), ácido fosforico (▼), 0.5% (peso/volumen) chondroitin 4 sulfato-0.5M ácido cítrico (▲), 0.5% (peso/volumen) ácido hialurónico-0.5M ácido cítrico (▶) y ácido glicólico (◀).

Efecto del gel de sílice en la cohesión

Se ensayó mejorar la cohesión de los cementos con la incorporación de un gel. Para ello, se ensayó el gel de sílice por su biocompatibilidad. Los geles de sílice preparados con soluciones acuosas de 0.5M ácido cítrico, 1M ácido glicólico y 0.5M ácido tartárico tuvieron un pH de *ca.* 4.39, 4.72, y 4.52, respectivamente. (Tabla II, sección 7.1). Mientras que los valores de pH de los ácidos carboxílicos fueron 1.74, 1.84 y 1.76, respectivamente (Tabla I, sección 7.1). Esta diferencia se reflejó en el pH de la pasta del cemento fraguado con ácido tartárico y del cemento fraguado con 0.5M ácido tartárico modificado con gel de sílice (16.8 g/l (SiO₂)). La evolución del pH de la pasta del cemento en función del tiempo se muestra en la figura 14. Los cambios del pH fueron más rápidos en la presencia del gel de sílice (Figura 14, línea azul). Mientras la subida del pH en la pasta del cemento modificado con el gel de sílice fue continua, en el cemento no modificado la subida fue interrumpida con una disminución del pH. La disminución del pH empezó después de 2.00 minutos de la mezcla (pH = 2.03) hasta alcanzar un pH de *ca.* 1.8 después de 5.30 minutos de mezclar la fase sólida y la fase líquida (Figura 14). El pH del cemento fraguado con el ácido tartarico alcanzó un pH

estable de 3.8 en 65 minutos después de la mezcla. Sin embargo, el cemento modificado con el gel de sílice tardó 57 minutos en alcanzar un pH estable de 3.4 (Figura 14). Estas diferencias resultaron en un tiempo de fraguado menor para el cemento modificado con gel de sílice en comparación con el cemento fraguado con el ácido tartárico (Figura 15). La modificación de las soluciones de los ácidos carboxílicos con gel de sílice disminuyó la desintegración de partículas del fosfato tricálcico- β (Figura 15). Esta mejora significativa en la cohesión de los cementos de brushita va asociada a la disminución del tiempo de fraguado final de los cementos modificados con el gel de sílice (Figura 15).

La presencia de la banda de vibración de tensión del enlace Si-O a 970 cm^{-1} y la banda de vibración del enlace Si-O-Si a 668 cm^{-1} en la matriz del cemento parece indicar la formación de un complejo entre los iones de calcio y los átomos de oxígeno del grupo hidroxilo del gel (Figuras 16 y 17). Este complejo podría actuar como núcleo para la precipitación de los cristales de brushita acelerando la reacción de fraguado. Esto coincide con los trabajos que han reportado que el grupo silanol (Si-OH) tiene un efecto catalizador de la nucleación de apatitas [211 y 212].

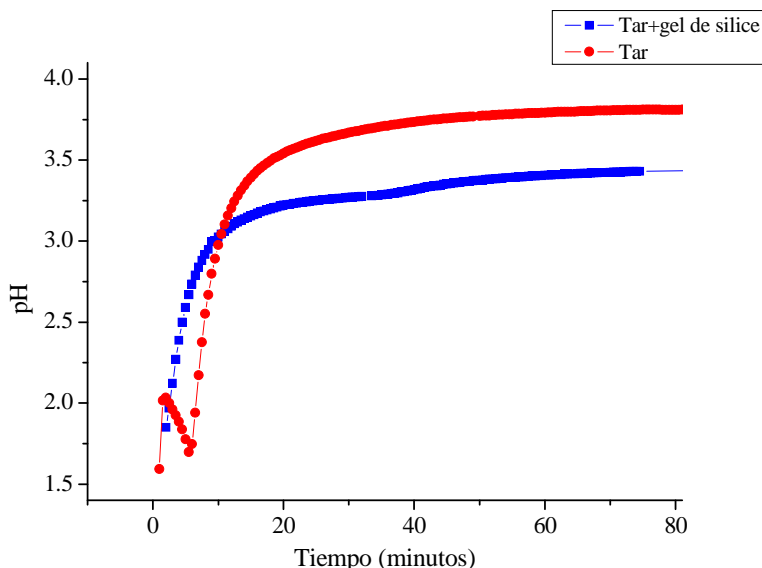


Figure 14. pH de la pasta del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido tartárico (Tar) y 0.5M ácido tartárico modificado con gel de sílice 16.8 g/l (SiO_2).

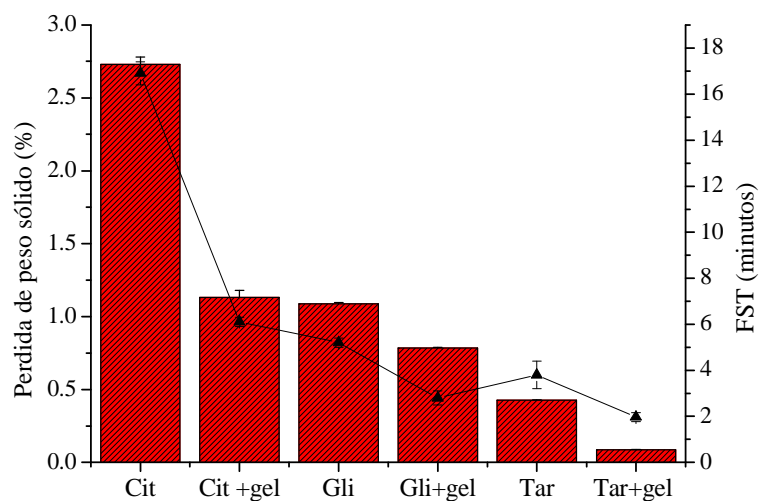


Figure 15. Tiempo de fraguado final (temperatura ambiente) y la Perdida de peso sólido del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido cítrico (Cit), 0.5M ácido cítrico modificado con gel de sílice 16.8 g/l (SiO_2), 1M ácido glicólico (Gli), 1M ácido glicólico modificado con gel de sílice 16.8 g/l (SiO_2), 0.5M ácido tartárico (Tar) y 0.5M ácido tartárico modificado con gel de sílice 16.8 g/l (SiO_2).

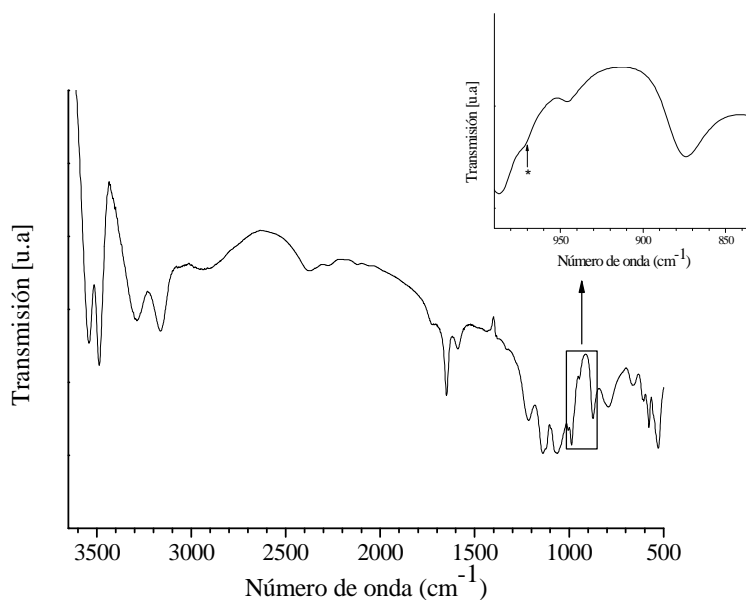


Figure 16. Espectro FTIR del cemento de brushita fraguado con 0.5M ácido tartárico modificado con gel de sílice 16.8 g/l (SiO_2). (*) Banda de vibración a número de onda de 970 cm^{-1} correspondiendo a la vibración de tensión de Si-O [213].

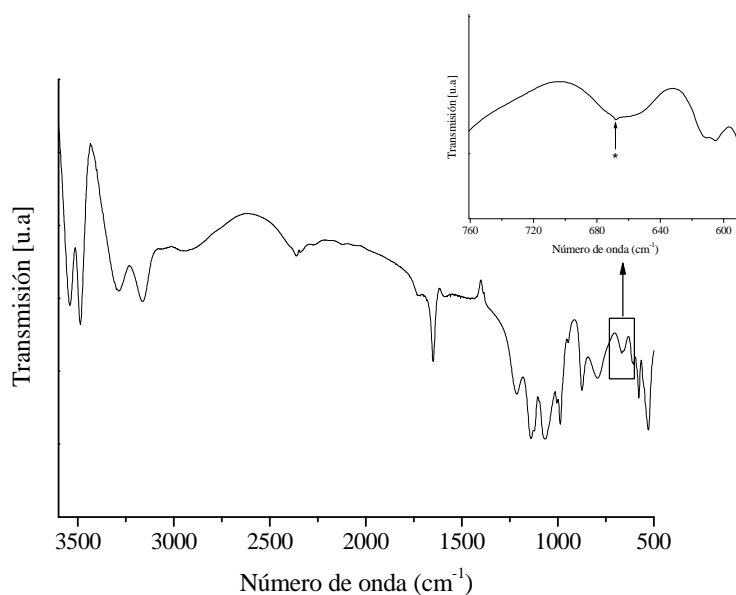


Figure 17. Espectro FTIR de COFC de brushita fraguado con 1M ácido glicólico modificado con gel de sílice 16.8 g/l (SiO_2). (*) Banda de vibración a número de onda de 668 cm^{-1} correspondiendo a la banda de vibración de Si-O-Si [213].

Transformación de brushita a hidroxiapatita

La brushita es metaestable en condiciones fisiológicas y se transforma a HA. Existen varios factores que controlan esta transformación *in vivo* como la renovación “turn over” del líquido intersticial, su composición proteica y el tamaño de la muestra del cemento. Esta transformación no deseada aumenta la acidez del medio circundante y retarda la reabsorción del cemento. Se ha demostrado que los sales de magnesio poco solubles en agua y el ácido pirofosforico inhiben la transformación a HA. En este apartado hemos realizado un estudio para evaluar el efecto de los ácidos carboxílicos en la transformación de brushita a HA en el cemento fraguado.

En la figura 1 se mostró que las soluciones de los ácidos carboxílicos aumentaron el FST de los cementos de brushita en comparación con el ácido fosforico. El tiempo de fraguado final del cemento preparado con agua es de $2\text{ minutos} \pm 0.5$.

Como la transformación de brushita a HA resulta en la liberación del ácido fosforico (reacción 6), se estudió el cambio del pH del tampón fosfato durante el periodo de incubación. El pH del tampón fosfato (renovado cada 24 h) varía de 5.1 a 6.8 después del primer día del experimento. El menor pH fue registrado para los cementos fraguados con el ácido cítrico seguido por el ácido glicólico. El cemento fraguado con el ácido fosforico rebajó el pH más que el ácido tartárico. Mientras, el cemento fraguado con agua fue el cemento que menos rebajó el pH del tampón (Figura 18). Después de tres días, el pH del tampón fosfato para todos los cementos de brushita varía de 7.2 a 7.3 y en ninguna vez rebajó menos de 7.05 a lo largo del tiempo de observación del experimento (Figura 18).

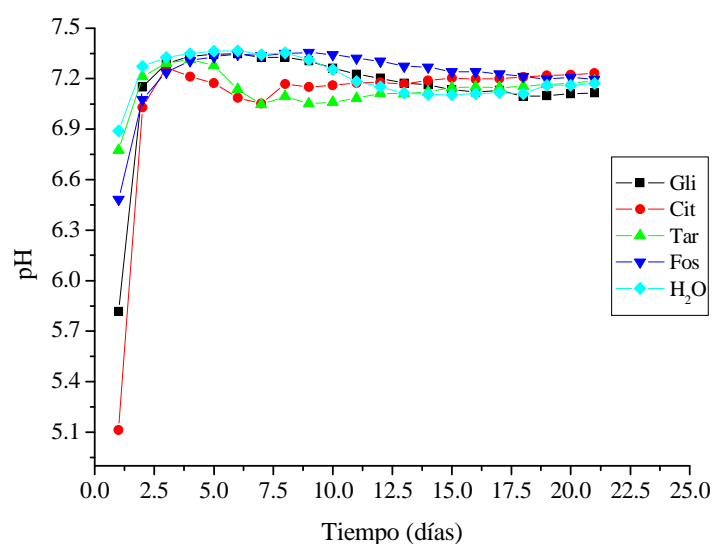


Figura 18. Cambio del pH del tampón fosfato inducido por las muestras de cemento de brushita fraguado con 2M ácido fosforico (Pi), agua bidestilada (H₂O), 0.5M ácido tartárico (Tar), 1M ácido glicólico (Gli), 0.5M ácido cítrico (Cit).

Se estudió como cambiaba la composición de los cementos durante el proceso de incubación utilizando la técnica de difracción de rayos X. El análisis de Rietveld reveló la aparición de monetita en la matriz del cemento fraguado con el ácido fosforico 24 h después de la incubación (Tabla 2). La aparición de hidroxiapatita en la matriz de los cementos de brushita fraguados con el ácido fosforico y el agua ocurrió después de 14 días de la incubación. Mientras, su aparición en la matriz de los cementos fraguado con los ácidos carboxílicos ocurrió después de 28 días (Tabla 2). Como se muestra en la

8.1.1 Resultados

tabla 2 la fracción de DCPD tiende a disminuir a medida que el tiempo de incubación aumenta mientras que la fracción de β -TCP se estabiliza o tiende a crecer.

Tabla 2. Análisis de Rietveld de los diagramas de difracción de rayos X de cementos de brushita.

La fase líquida del cemento	Tiempo (días)	Composición del cemento (%)			
		DCPD	β -TCP	DCPA	HA
Ácido fosforico	0	79	21	-	-
	1	92	2	6	-
	3	77	23	-	-
	14	69	26	-	5
	28	81	4	-	15
Agua	0	74	26	-	-
	1	74	26	-	-
	3	75	25	-	-
	14	42	54	-	4
	28	58	28	-	14
Ácido cítrico	0	79	21	-	-
	1	66	34	-	-
	3	40	60	-	-
	14	34	63	-	-
	28	36	32	-	32
Ácido glicólico	0	87	13	-	-
	1	81	19	-	-
	3	51	49	-	-
	14	54	41	-	-
	28	43	24	-	33
Ácido tartárico	0	87	13	-	-
	1	85	15	-	-
	3	54	43	-	-
	14	52	48	-	-
	28	50	17	-	33

Para explicar la aparición tardía de HA en cementos de brushita fraguados con los ácidos carboxílicos, se ha estudiado la transformación de brushita a monetita empleando la técnica de DSC. Se realizó el experimento en un rango de 50 a 500 °C. Las curvas de DSC de cementos de brushita presentan tres picos endotérmicos. Los primeros dos picos por debajo de 200 °C se corresponden con la deshidratación de brushita a monetita según la reacción:



Mientras, el tercer pico (425 °C) se corresponde con la descomposición de monetita a pirofosfato cálcico según la reacción:

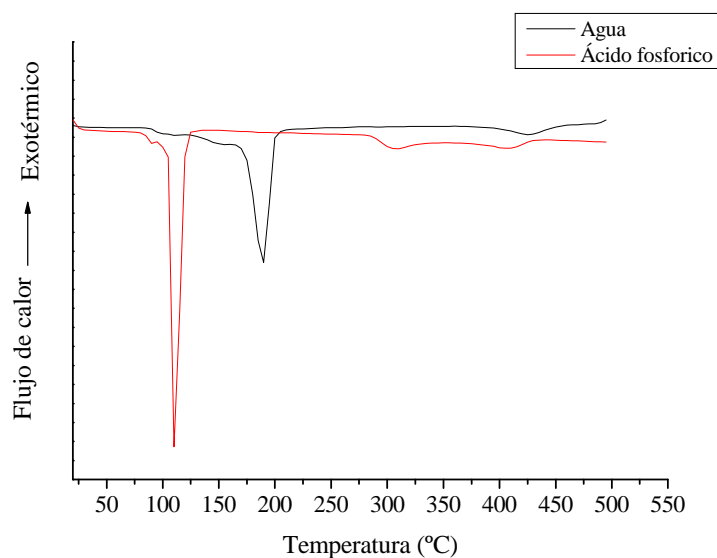


Figura 19. Curvas de DSC de cementos de brushita fraguados con 2M ácido fosforico y agua bidestilada (H₂O).

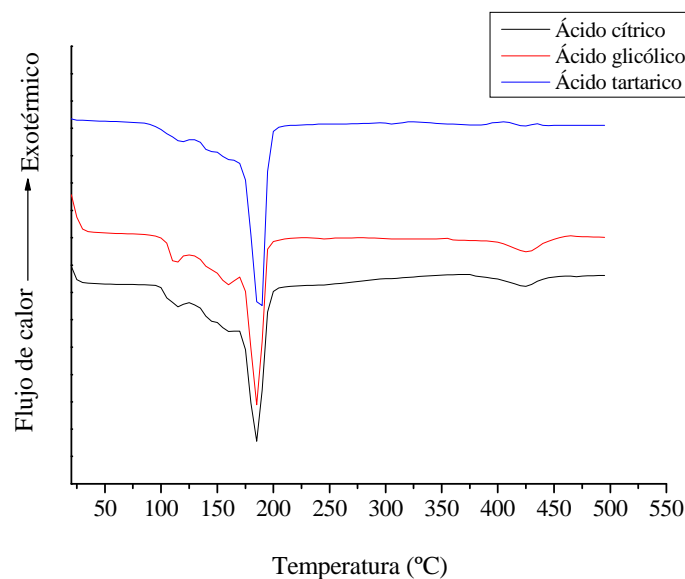


Figura 20. Curvas de DSC de cementos de brushita fraguados con 0.5M ácido cítrico, 1M ácido glicólico y 0.5M ácido tartárico.

La deshidratación de brushita a monetita en los cementos fraguados con el ácido fosforico y el agua tuvo lugar a temperaturas más bajas que el resto de los cementos de brushita (Figuras 19 y 20). La entalpía necesaria para la deshidratación de brushita fue mayor para los cementos fraguados con los ácidos carboxilicos siguiendo el orden de ácido tartárico > ácido glicólico > ácido cítrico > el agua > ácido fosforico (Figura 21).

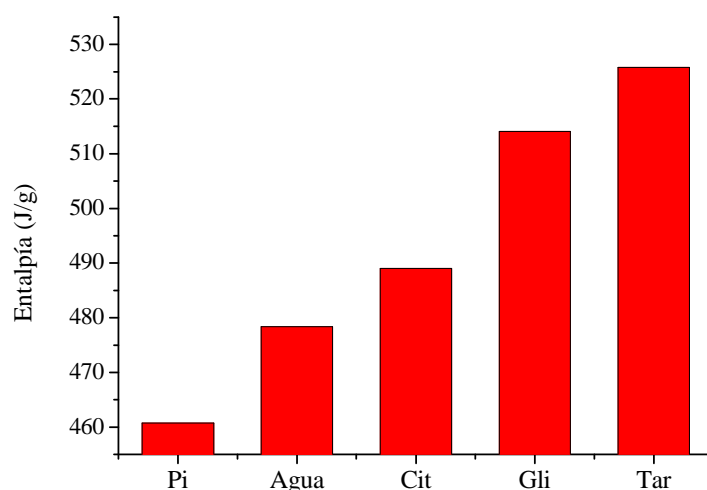


Figura 21. Entalpía necesaria para deshidratar la brushita preparada con 2M ácido fosforico (Pi), agua bidestilada (H_2O), 0.5M ácido tartárico (Tar), 1M ácido glicólico (Gli) y 0.5M ácido cítrico (Cit).

Efecto del C4S en la regeneración ósea con cemento de brushita

El C4S posee efectos anti-inflamatorios e incrementa la capacidad regenerativa del hueso dañado [214]. Se ha mostrado que la modificación de cemento de fosfato cálcico con C4S y colágeno tipo I mejoró la formación de nuevo hueso y el remodelado óseo en las etapas tempranas de la regeneración ósea [214]. Además, el recubrimiento de la superficie de titanio con colágeno tipo I y C4S mejoró el remodelado óseo y la formación de nuevo hueso alrededor del implante de titanio después de 4 semanas de su implantación *in vivo* [215]. El uso de C4S ha mejorado también la cohesión del cemento de brushita. Por ende, hemos ensayado el efecto del C4S en la regeneración ósea con cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico. Para ello, hemos utilizado el modelo de cámara de titanio dónde se puede evaluar la regeneración ósea vertical.

La figura 22 muestra que la formación de nuevo hueso ocurre desde la superficie externa del hueso parietal a lo largo de las paredes de cámara de titanio y continua hacia su centro. Un comportamiento similar fue observado en estudios de regeneración ósea que han utilizado el modelo de cámara de titanio. [119]

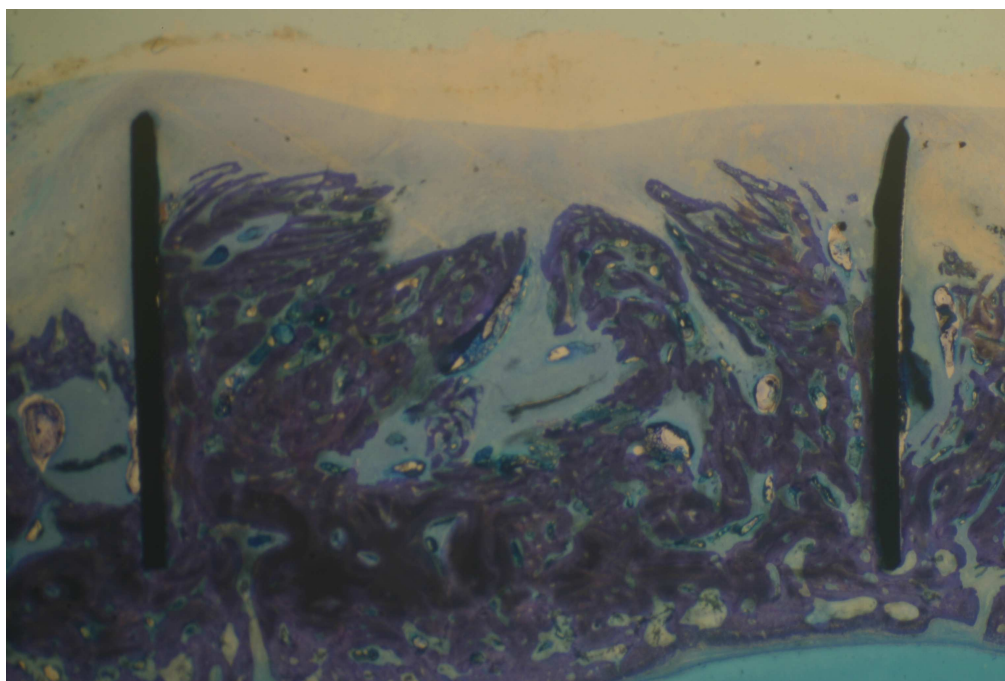


Figura 22. Regeneración ósea mediada por granulado de cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico estudiado en modelo de cámara de titanio. La formación ósea va desde los laterales hacia el centro (8X).

Los resultados muestran que ha habido reabsorción de los gránulos del cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico. Sin embargo, la cantidad de los gránulos presente en la cámara ha sido mayor en el caso del cemento fraguado con 1M glicólico-2% (peso/volumen) C4S indicando una reabsorción más lenta en este caso (Figura 24 y Tabla 3).

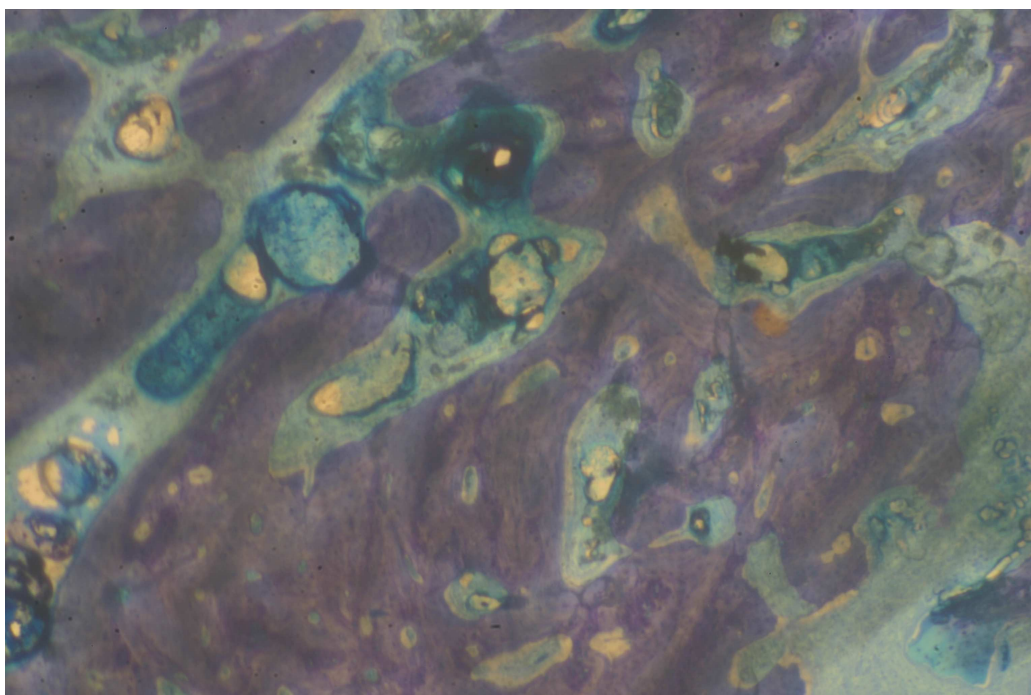


Figura 23. Hueso neo-formado mediado por gránulos de brushita fraguado con 1M ácido glicólico (40X).

Esta biodegradación ha sido también mediada por macrófagos como esta indicado por la presencia de gránulos de cemento fagocitado (Figura 25) y el desgaste de los gránulos (Figura 26).

Los osteoblastos forman una línea en la interfase entre el hueso y el gránulo del cemento de brushita depositando la matriz ósea no mineralizada, y que a posteriori se mineraliza, formando el hueso trabecular inmaduro (Figura 26). Se puede también observar que el hueso cerca de la superficie de los gránulos es menos maduro que el hueso más lejos indicando que la formación ósea ocurre siguiendo la reabsorción de los gránulos. Este hueso neoformado rodea los osteoblastos induciendo su transformación a osteocitos (Figura 26 y 27).

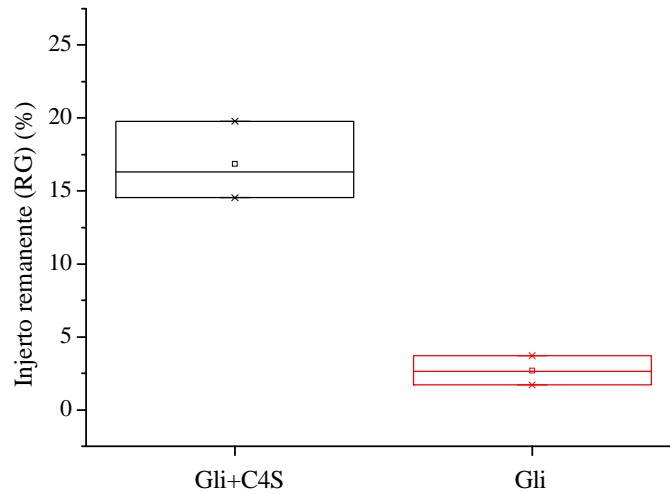


Figura 24. Gránulos de cemento de brushita remanentes después de 8 semanas de su implantación *in vivo*. La cantidad de gránulos remanentes es mayor en el caso del cemento fraguado con C4S ($P < 0.05$).

Tabla 3. Media y desviación estándar (SD) de la cantidad de gránulos de brushita remanentes en cada grupo experimental.

Grupo experimental	Injerto remanente (%)	SD
Glicólico	3	1
Glicólico + C4S	17	3

La figura 28 muestra lagunas de Hawship indicando el remodelado óseo que se lleva acabo por los osteoclastos. Aunque la regeneración ósea es ligeramente mayor en el cemento modificado con el C4S, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 29 y Tabla 4).

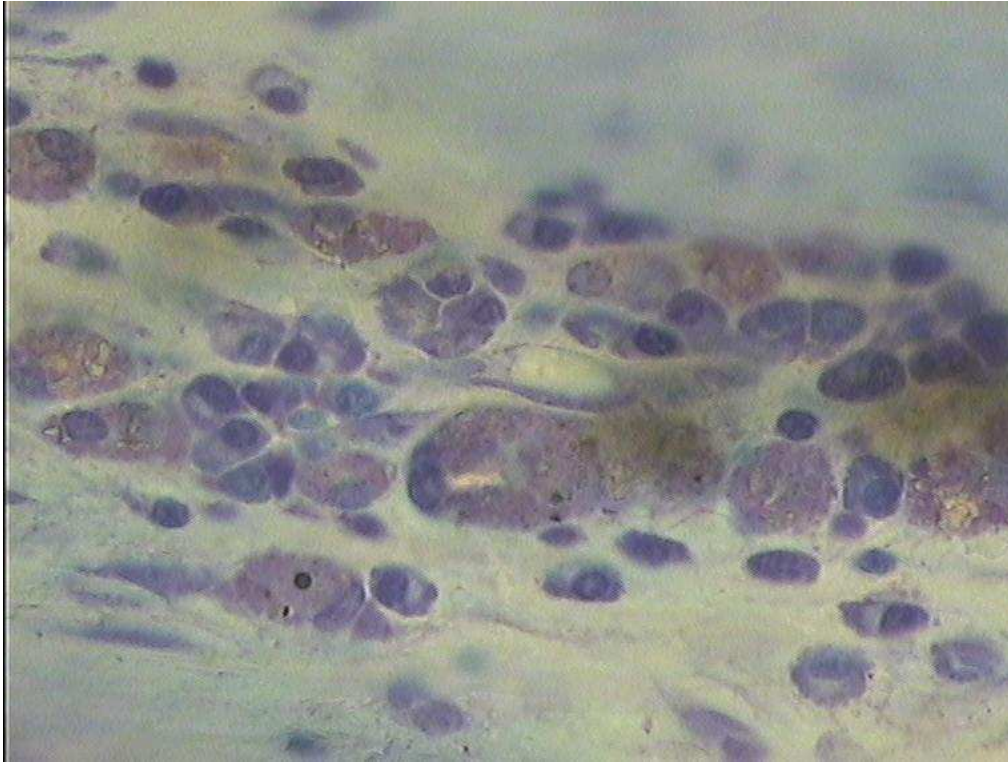


Figura 25. Gránulos de cemento de brushita fagocitados por macrófago (100X).

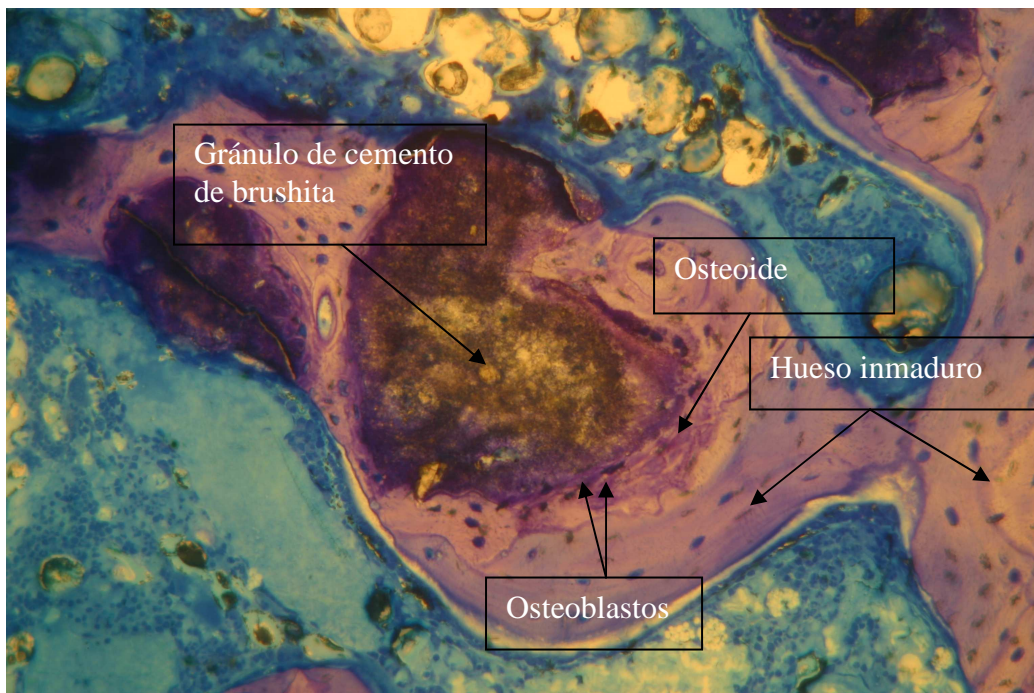


Figura 26. Formación de hueso alrededor de gránulos de cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico (100 X).

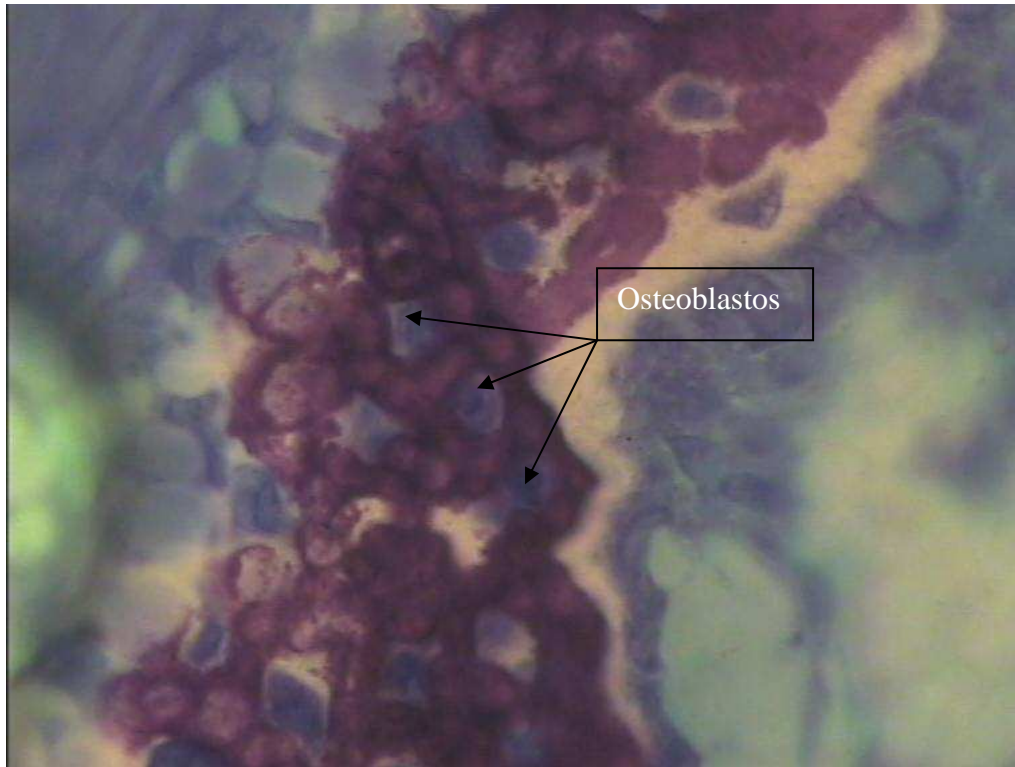


Figura 27. Osteoblastos rodeados por matriz ósea no mineralizada (osteóide) (100X).

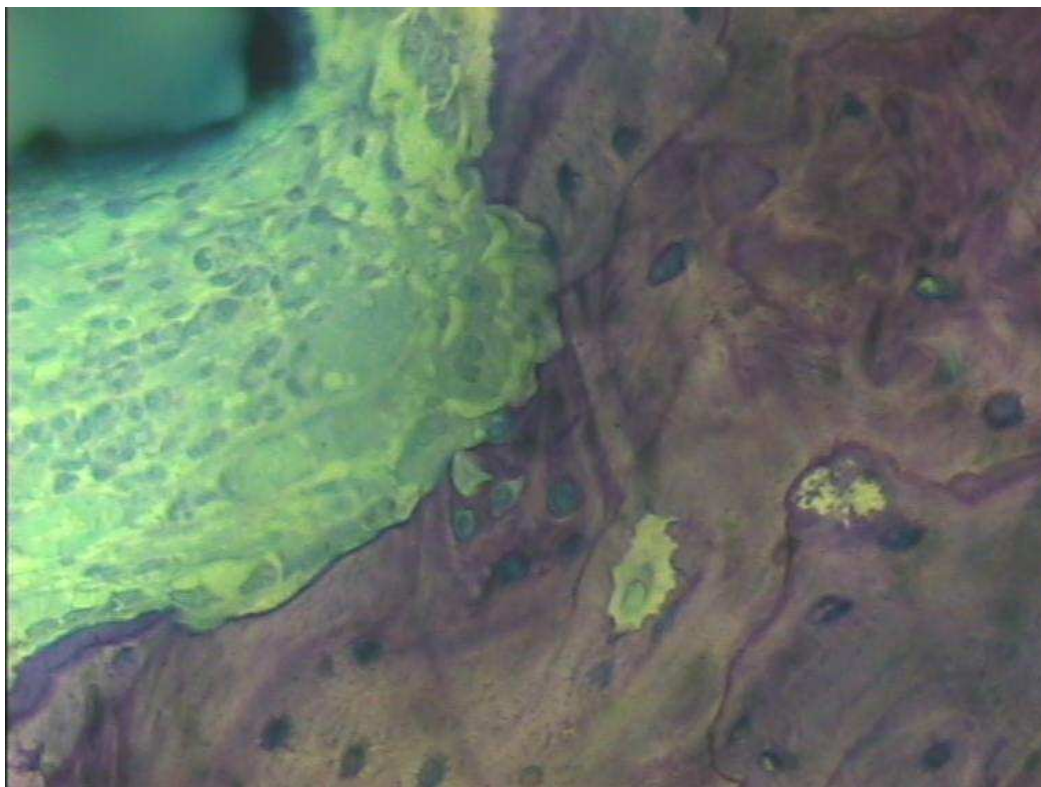


Figura 28. Laguna de Howship mostrando el remodelado óseo llevado a cabo por osteoclasto (100X).

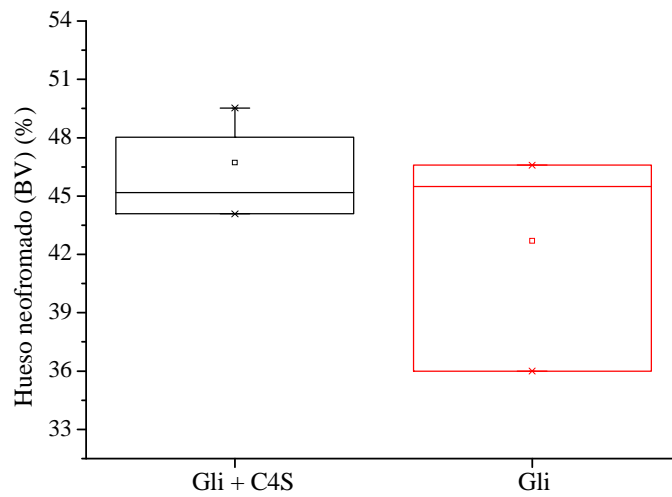


Figura 29. Efecto del chondroitin 4 sulfato (C4S) en la regeneración ósea obtenida con los gránulos de cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico. Las diferencias entre los dos grupos no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Tabla 4. Media y desviación estándar (SD) del hueso neoformado en cada grupo experimental.

Grupo experimental	Hueso neoformado (%)	SD
Glicólico	43	6
Glicólico + C4S	47	3

8.1.2 Discusión

La estructura del fosfato dicálcico dihidratado consta de dos bicapas paralelas. Una bicapa consta de láminas de iones de calcio y fosfato mientras que las moléculas de agua forman la segunda bicapa. En soluciones acuosas, la bicapa hidratada forma la superficie del cristal de brushita [216] debido a la alta concentración de moléculas de agua. Los iones de calcio y fosfato solo pueden interaccionar con el medio a su alrededor en los bordes donde se interrumpe la capa del agua [216] permitiendo la disolución de estos iones del cristal de brushita al medio incubador a una velocidad determinada por el equilibrio químico entre la disolución y la recristalización [146]. Este es el modelo propuesto de disolución de brushita que puede dar lugar a la precipitación de hidroxiapatita [136].

Los cementos de brushita fraguados con los ácidos carboxílicos muestran tiempos de fraguado final más largos que el cemento fraguado con ácido fosfórico o agua, lo que indica un efecto retardante de los ácidos carboxílicos en la reacción de fraguado (Tabla 1). Se ha detectado en un estudio reciente la formación de complejos intermedios de fosfato dicálcico-citrato en el cemento de brushita fraguado con ácido cítrico. [217] El grupo carboxílico α de los ácidos orgánicos se enlaza con el ión de calcio expuesto en la superficie del cristal de brushita [218] como está indicado por la presencia de las bandas de vibración del complejo carboxilato cálcico a números de onda de 1589 cm^{-1} y 1385 cm^{-1} (Figuras 9 y 10). Este enlazamiento permite a los ácidos carboxílicos inhibir el crecimiento del cristal de brushita [146 y 196], y en consecuencia inhibir la reacción de fraguado del cemento de brushita. Sin embargo, los ácidos carboxílicos no forman una parte de la estructura de los cristales del cemento [146] como parece indicar la ausencia de las bandas de vibración del complejo carboxilato cálcico en los espectros FTIR después de su incubación en agua (Figura 10).

Las partículas desintegradas de la superficie del cemento de brushita son partículas de fosfato tricálcico- β sea cual sea el ácido orgánico empleado. El tamaño y la carga eléctrica de la superficie de las partículas de fosfato tricálcico- β liberados son similares y no dependen del ácido utilizado (Tabla 1).

Los ácidos orgánicos pueden acomplejar con el calcio en la superficie de las partículas del fosfato tricálcico- β influyendo en su solubilidad en agua. De esta manera, la solubilidad del fosfato tricálcico- β en el agua puede depender de la solubilidad del

complejo carboxilato cálcico. Un comportamiento similar se ha sugerido para explicar la reducción de la solubilidad de los ortofosfatos cálcicos por los iones de pirofosfato [219]. La figura 1 muestra que la desintegración superficial del cemento de brushita disminuye en la secuencia de ácido cítrico > ácido glicólico > ácido tartárico. La solubilidad en agua del carboxilato cálcico aumenta en la secuencia de ácido cítrico > ácido glicólico > ácido tartárico. Así, se puede concluir que cuando más soluble es el carboxilato cálcico, más partículas del fosfato tricálcico- β se liberan al medio de incubación. Por otro lado, la carga eléctrica negativa de los ácidos carboxílicos cuando se desprotonan (pérdida de H^+) puede incrementar la repulsión entre las partículas del cemento aumentando la desintegración de las partículas de β -TCP. Debido a la diferencia en la presión osmótica, el flujo de las partículas del cemento hacia el medio incubador es favorable y facilita la pérdida de las partículas de β -TCP.

Se ha observado que cuando el tiempo de fraguado del cemento es mas corto mejor es la cohesión [102]. Las figuras 1 y 15 muestran que la pérdida de peso sólido aumenta con el incremento del tiempo de fraguado final del cemento de brushita.

La figura 1 muestra también que la pérdida de peso sólido es mayor cuando mas pronto se incuba el cemento confirmando la propiedad transitoria de la cohesión del cemento cálcico. Las partículas del cemento están unidas debido al equilibrio entre las fuerzas físicas de atracción (como las fuerzas de van der Waal) y fuerzas repulsivas como la doble capa eléctrica [220] y la interacción estérica (en la presencia de polisacáridos) [105]. A diferencia del cemento fraguado, la pasta del cemento es un material poroso dónde los cristales del cemento están rodeadas por una fase liquida continua. Lo que incrementa la distancia entre las partículas favoreciendo la desintegración de las partículas del fosfato tricálcico- β .

Se han utilizado dos polisacáridos solubles en agua para aumentar la viscosidad de la solución acuosa de 0.5M ácido cítrico. Así, se han empleado el chondroitin 4 sulfato (M_w : 29 KDa) y el ácido hialurónico (M_w : 1730 KDa) en concentración de 0.5% (peso/volumen). El ácido hialurónico resultó más eficiente en reducir la desintegración de la pasta del cemento preparado con el ácido cítrico que la desintegración del cemento ya fraguado (Figura 2). La adición del ácido hialurónico ha sido más eficaz en aumentar la viscosidad de la solución 0.5M ácido cítrico que el chondroitin 4 sulfato. El ácido hialurónico es un polímero compuesto de unidades repetidas del ácido glucorónico y N-acetil glucosamina. La repulsión eléctrica causada por la carga negativa de las unidades

resulta en una molécula larga de alto peso molecular excepcionalmente estriada. Los polisacáridos solubles en agua han sido utilizados como agentes para mejorar la cohesión de los sistemas basados en cementos. Estas moléculas aumentan la capacidad de retención del agua de la pasta del cemento y reduce el riesgo de separación de la pasta del cemento [221]. Sin embargo, la mejora de la cohesión utilizando los polisacáridos solubles en agua depende de la concentración del polisacárido utilizado. Se ha reportado que el aumento de la concentración del ácido hialurónico de 1.0% a 1.5% resultó en decaimiento dramático en la cohesión del cemento [97].

A pesar de la renovación del medio incubador y mantener un pH adecuado para la precipitación de HA, la transformación de brushita a HA tardó 14 días en los cementos fraguados con el ácido fosforico y agua. Mientras, la HA apareció después de 28 días en los cementos fraguados con los ácidos carboxilicos (Tabla 2). Esto indica un efecto inhibitor de los ácidos carboxilicos de la transformación a HA. Los experimentos de DSC mostraron que la energía necesaria para la deshidratación de brushita fue mayor en la secuencia de ácido tartárico > ácido glicólico > ácido cítrico (Figura 21) de acuerdo con la solubilidad del complejo carboxilato cálcico de los ácidos carboxilicos. Esto podría indicar que la ruptura de este complejo es necesaria para la transformación a monetita. Se demostró que la adición del ácido cítrico a la mezcla de fosfato tricálcico- β -TCP y fosfato monocálcico impidió la transformación de brushita [126 y 222].

La matriz extracelular (ECM) no solo es un andamio pasivo para las células del hueso sino también posee varios componentes que pueden unirse a citoquinas e interaccionar con las células mediante integrinas y otros receptores específicos en la membrana celular, influyendo, de manera directa o indirecta, en el crecimiento, la migración, la diferenciación y la adhesión celular [215]. El chondroitin sulfato forma parte del biglicano y la decorina, los proteoglicanos principales de la matriz extracelular y en un estudio *in vitro* se ha reportado que el recubrimiento de superficie de titanio con colágeno tipo 1 y chondroitin sulfato aceleró significativamente la adhesión, la extensión y la diferenciación de los osteoblastos [223].

Aunque la regeneración ósea ha sido mayor con gránulos de cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico y 2% (peso/volumen) C4S que con gránulos de cemento fraguado con 1M ácido glicólico (Figura 29), el test estadístico confirmó la

hipótesis nula de que estas diferencias no son significativas. Sin embargo, la modificación de cemento de hidroxiapatita con colágeno tipo I y chondroitin sulfato ha aumentado significativamente el número de osteoclastos y células mononucleares después de 4 y 7 días de su implantación en tibia de ratón [214]. Al cabo de 28 días, la formación de nuevo hueso y el contacto directo con el hueso ha sido significativamente mayor que el cemento de HA modificado solamente con colágeno tipo I [214]. Resultados similares fueron obtenidos de la implantación *in vivo* de implante de titanio recubierto con colágeno tipo I y chondroitin sulfato [214]. Estos resultados podrían ser debido a la interacción del chondroitin sulfato con los osteoclastos y osteoblastos, los grupos de sulfato del chondroitin sulfato contribuyen a su carga eléctrica negativa, y pueden acelerar la adhesión de la ECM a integrinas y la formación de adhesiones focales (ambos procesos dependen de los iones de calcio) [224 y 225]. Estudios recientes han reportado que el composite colágeno- chondroitin sulfato afecta la migración y la diferenciación de células precursoras de osteoblastos y osteoclastos [226]. Además, los proteoglicanos y sus cadenas de glucosaminoglicanos median la unión de las citoquinas y factores de crecimiento con ECM y la superficie celular [227]. Por ejemplo, el factor plaquetario 4, un prototipo de varios factores de crecimiento, tiene alta afinidad al chondroitin sulfato [228].

La modificación del cemento de HA con el chondroitin sulfato ha provocado la presencia, en la matriz del cemento fraguado, de mayor porcentaje de reactantes que no se han transformado a HA [223]. Se ha demostrado también que el C4S inhibe significativamente la formación de HA, un efecto que esta atribuido a la adsorción de la molécula a la superficie de HA inhibiendo la velocidad del crecimiento cristalino [229]. Se ha propuesto que las interacciones electrostáticas entre los iones de Ca^{2+} en la superficie del mineral y los grupos de carboxilato y sulfato del C4S (carga negativa) inducen la adsorción del C4S [230]. La modificación del cemento de brushita con C4S inhibió la reabsorción de los gránulos del cemento (Figura 24). Se ha reportado que la adsorción de proteínas de suero a la superficie de fosfato tricálcico amorfo inhibe la tasa de disolución del mineral [231]. Brushita es metastable en condiciones fisiológicas lo que provoca su disolución y fragmentación *in vivo*. La adsorción del C4S a la superficie de brushita puede inhibir la disolución del mineral inhibiendo su reabsorción.

8.2 Cementos de brushita modificados con estroncio

Bisfosfonatos, moduladores selectivos de receptores de estrógeno y renalato de estroncio son fármacos que actualmente se utilizan en el tratamiento de osteoporosis. [180] Así, la incorporación de iones de Sr^{2+} en biocerámicas de fosfato cálcico podría mejorar su osteointegración debido a la estimulación de los osteoblastos y la inhibición de los osteoclastos por los iones de Sr^{2+} liberados. Esto se ha llevado a cabo en varios estudios sustituyendo el calcio por estroncio en la red del cristal de fosfatos cálcicos (hidroxiapatita y fosfato tricálcico) preparados por sinterización a altas temperaturas [232] o mediante la introducción de iones de estroncio durante el proceso de fraguado de cemento óseo de hidroxiapatita [233]. Las cerámicas de hidroxiapatita son poco solubles en condiciones fisiológicas resultando en una liberación baja de los iones de estroncio. Landi et al sintetizaron hidroxiapatita sustituida por estroncio con un contenido de estroncio de 8.7% (peso/peso) [234]. La liberación *in vitro* de iones de Sr^{2+} disminuyó de 6.060 ppm después de 24 h a 0.602 ppm después de 7 días de incubación. Además, El Sr^{2+} inhibe los osteoclastos responsables de la degradación *in vivo* de cerámicas basadas en HA limitando su liberación de estas cerámicas.

En comparación con las biocerámicas basadas en HA, la alta solubilidad química de los fosfatos secundarios resulta en una liberación más alta de los iones de estroncio independientemente de la actividad osteoclastica. Esencialmente, existen dos métodos para introducir los iones de estroncio en los cementos de brushita: el uso de una sal de estroncio soluble en agua y el uso de reactantes sustituido por estroncio para la formación del COFC.

8.2.1 La adición de sal de estroncio soluble en agua (SrCl_2)

8.2.1.1 Resultados

Cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico

La adición de SrCl_2 a la fase sólida del cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico en relación P/L de 2.5 aumentó significativamente su FST. En la figura 1 se muestra como el cemento modificado con 5% SrCl_2 fraguó en *ca.* 19 minutos mientras el cemento modificado con 10% tardó 45 minutos en fraguar.

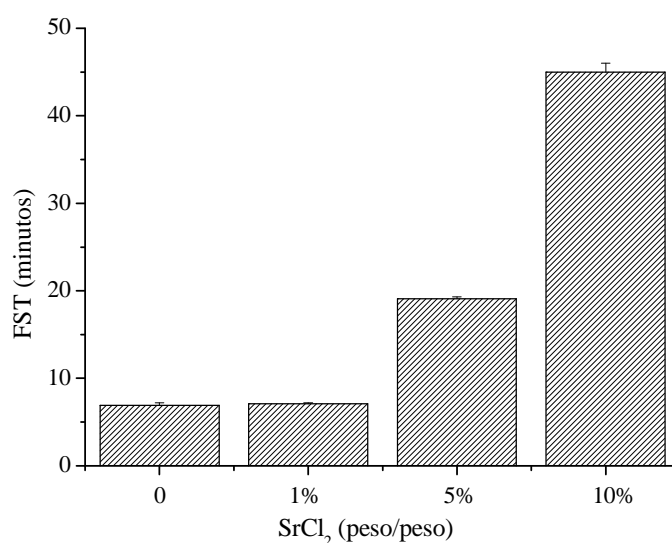


Figura 1. Efecto de los iones de estroncio en el tiempo de fraguado final (temperatura ambiente) de los cementos de brushita fraguados con 1M ácido glicólico.

La figura 2 muestra la tensión diametral de los cementos de brushita modificados con SrCl_2 . La adición del SrCl_2 no afectó la DTS de los cementos modificados con concentraciones de SrCl_2 por debajo de 5% (peso/peso). Sin embargo, la DTS disminuye significativamente con la adición de SrCl_2 a una concentración del 10% (peso/peso). La desintegración de las partículas de fosfato tricálcico- β en este cemento fue medida por la pérdida de peso sólido (Figura 3), en muestras incubadas en agua al FST. Se puede apreciar que la modificación con iones de estroncio del cemento de brushita fraguado con ácido glicólico aumentó la pérdida de peso sólido. Este aumento fue de 0.67% para el cemento fraguado sin SrCl_2 a 1.24% para el cemento fraguado con SrCl_2 10% (peso/peso) (Figura 3).

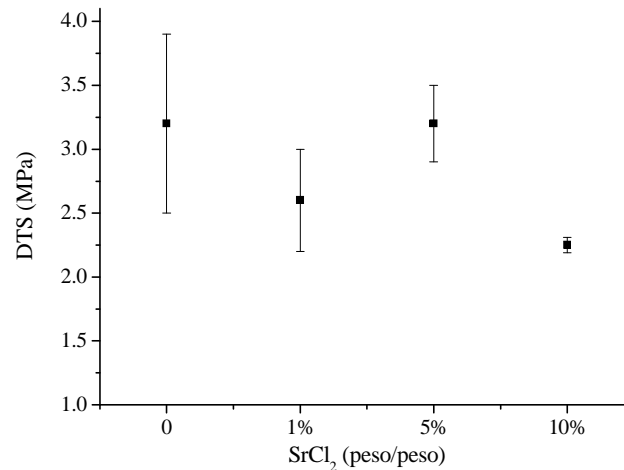


Figura 2. Efecto de los iones de estroncio en la fuerza de tensión diametral (DTS) de los cementos de brushita fraguados con 1M ácido glicólico.

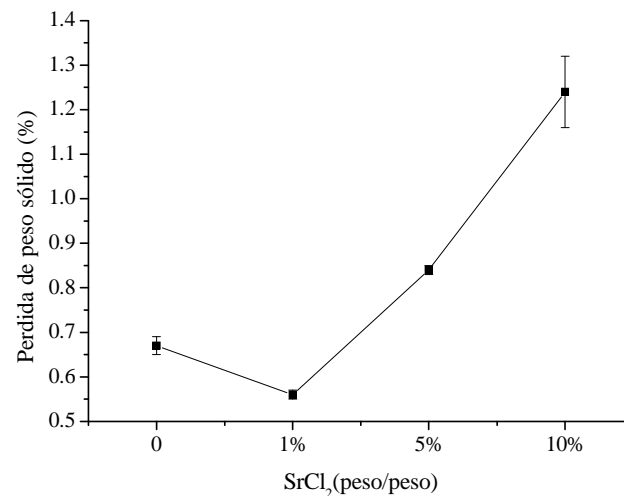


Figura 3. Cohesión de cementos de brushita fraguados con 1M ácido glicólico y modificados con la adición de SrCl₂.

Estructuralmente, la matriz de los cementos esta compuesta principalmente de brushita y residuos de β -TCP no reaccionado (Figura 4). Además, la SEM mostró que la matriz del cemento esta formada principalmente de cristales prismáticos y en forma de placa (Figura 5). El análisis de Rietveld desveló un aumento en el volumen de la celdilla del

crystal de brushita (Figura 6). Este aumento es proporcional a la concentración de los iones de estroncio, lo que indica claramente que el Sr^{2+} ha sustituido al Ca^{2+} en el cristal.

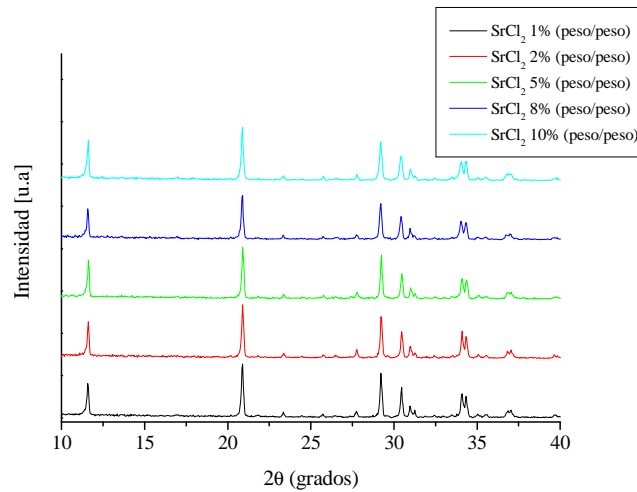


Figura 4. Diagrama de difracción de rayos X de los cementos de brushita fraguados con 1M ácido glicólico y modificados con distintas concentraciones de SrCl_2 .

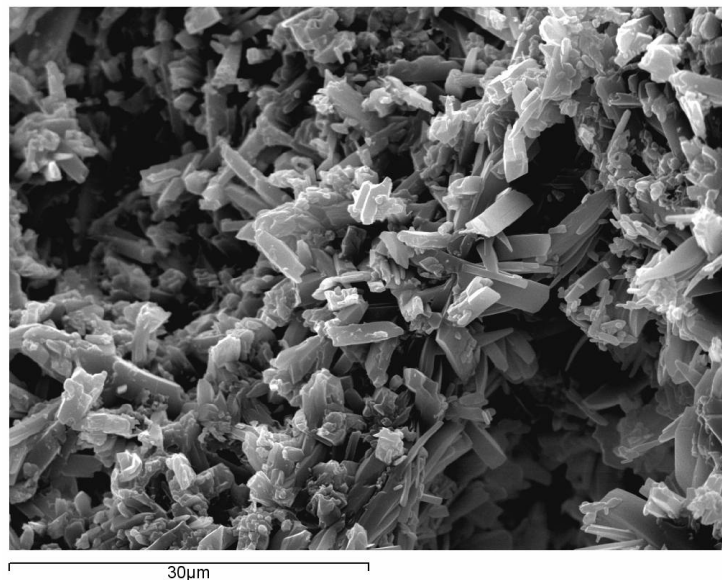


Figura 5. Imagen de microscopia electrónica de barrido (SEM) de la superficie de rotura del cemento de brushita fraguado con 1M ácido glicólico y modificado con SrCl_2 5% (peso/peso).

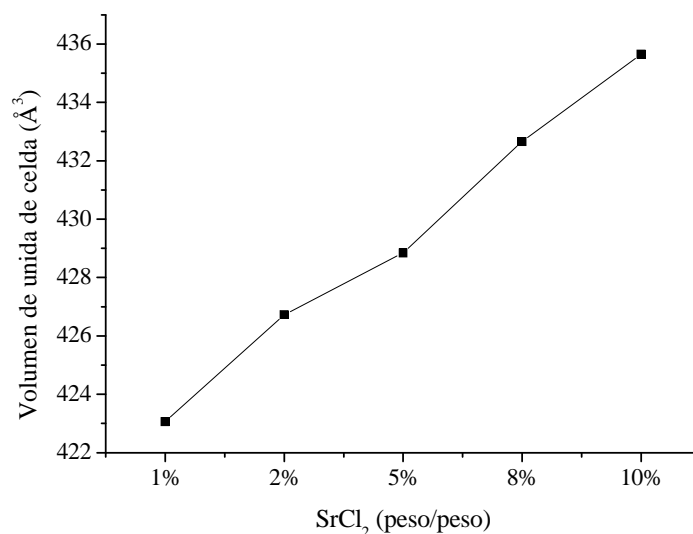


Figura 6. Efecto de los iones de estroncio en el volumen de la celdilla del cristal de brushita en cementos fraguados con 1M ácido glicólico.

Los resultados de FST, DTS y la cohesión de cementos de brushita suponen limitaciones a la concentración de iones de estroncio en el cemento de brushita, si se quiere desarrollar un cemento compatible con los requisitos para su uso clínico. Hemos planteado solucionar este problema con la adición simultánea de pirofosfato sódico y desarrollar un nuevo sistema portador de iones de estroncio basado en el fosfato tricálcico- β .

Cementos de brushita fraguados con ácido fósfórico

Se prepararon cementos de brushita fraguados con 2M ácido fosforico en relación P/L de 4 en vez de 2.5 para mejorar las propiedades mecánicas. La fase sólida del cemento fue modificada con la adición de SrCl₂ y pirofosfato sódico.

La figura 7 representa el tiempo de fraguado final de cementos de brushita en función de la concentración de SrCl₂ y pirofosfato sódico. Se puede observar que los dos afectan significativamente el tiempo del fraguado final. En los cementos libres de pirofosfato, la adición del SrCl₂ en concentración de 5% y 10% aumentó el tiempo de fraguado final del cemento de brushita a 1.8 y 8.3 minutos, respectivamente. Mientras en cementos

libres de estroncio, la adición del pirofosfato sódico en concentraciones de 0.54, 1.08, 2.16 y 3.24% aumentó el tiempo de fraguado final del cemento de brushita a 1.4, 2.7, 16 y 32 minutos, respectivamente. Sin embargo, se alcanzó un límite ya que los cementos modificados con 5.4% pirofosfato fraguaron en 24 minutos.

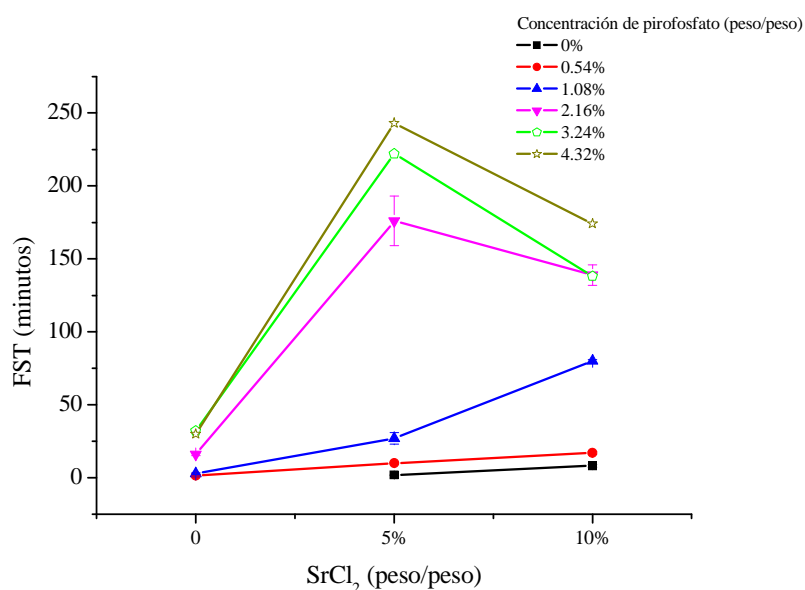


Figura 7. Influencia de los iones de estroncio y pirofosfato en el tiempo de fraguado de los cementos de brushita a temperatura ambiente.

La adición simultanea de los iones de estroncio y pirofosfato fue más eficaz en aumentar el tiempo de fraguado de los cementos de brushita que su adición de forma separada. El cemento de brushita modificado con 5% SrCl₂ y 4.32% pirofosfato sódico fraguó en 240 minutos (Figura 7). Sin embargo, el tiempo de fraguado se disminuyó en los cementos modificado con 10% SrCl₂ a concentraciones del pirofosfato sódico iguales o mayores de 2.16%.

La figura 8 muestra la fuerza de tensión diametral (DTS) de los cementos en función de la concentración del pirofosfato sódico para tres concentraciones de SrCl₂. Los iones de estroncio no mejoraron la fuerza de tensión diametral de los cementos de brushita libres de pirofosfato. Sin embargo, la tensión diametral se ha mejorado significativamente a concentraciones ascendientes del pirofosfato en los cementos de brushita libres de estroncio.

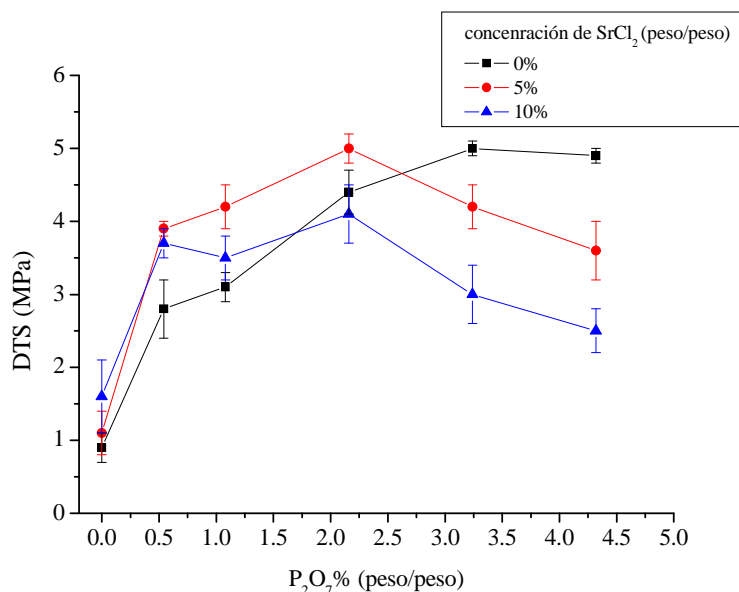


Figura 8. Fuerza de tensión diametral (DTS) de los cementos de brushita en función de la concentración de pirofosfato a distintas concentraciones de estroncio.

La adición de $SrCl_2$ al 5% fue más eficaz que al 10% en aumentar la fuerza de tensión diametral de los cementos modificados con pirofosfato sódico a concentraciones iguales o menores de 2.16%. Sin embargo, la fuerza de tensión diametral de los cementos de brushita modificados con estroncio a concentraciones de pirofosfato mayores de 2.16% disminuyó tal como se puede observar en la figura 8.

Se estudió la desintegración de partículas de β -TCP del cemento de brushita modificado con 2.16% de pirofosfato a concentraciones de $SrCl_2$ de 0%, 3%, 5%, 8% y 10%. La figura 9 muestra que la pérdida de peso sólido fue significativamente afectada por los iones de estroncio, aumentándose a concentraciones ascendientes de $SrCl_2$ hasta 5%. Sin embargo, el aumento de la concentración de $SrCl_2$ a 8% y 10% disminuyó la pérdida de peso sólido del cemento de brushita.

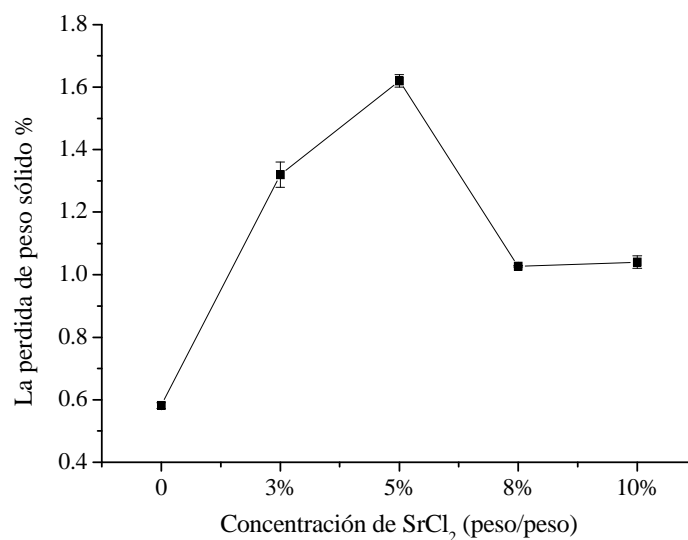


Figura 9. Efecto de los iones de estroncio en la cohesión de cementos de brushita modificados con 2.16% pirofosfato sódico.

La figura 10 muestra los diagramas de difracción de los cementos fraguados con distintas concentraciones de SrCl_2 y pirofosfato sódico.

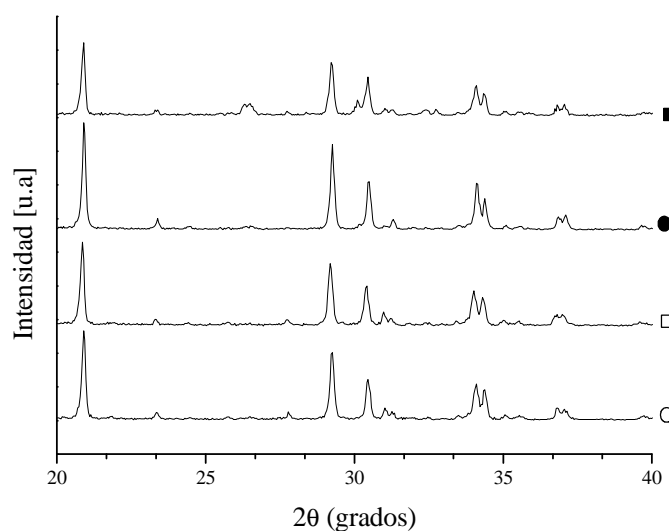


Figura 10. Diagramas de difracción de rayos X de los cementos de brushita recuperados de la prueba de tensión diametral y modificados con 10% (peso/peso) SrCl_2 (cuadro relleno); 5% (peso/peso) (circulo relleno); 10% (peso/peso) SrCl_2 y 2.16% pirofosfato (cuadro vacío); 5% (peso/peso) SrCl_2 y 2.16% (peso/peso) (circulo vacío).

Los resultados del análisis de Rietveld muestran que los cementos están compuestos principalmente de brushita y residuos de fosfato tricálcico- β no reaccionado (Tabla 1). Además, se detectó la presencia de monetita en varias formulaciones. Por ejemplo, la monetita forma el 27% del cemento modificado con 10% (peso/peso) SrCl_2 y 1.08% (peso/peso) pirofosfato. Merece mencionarse que la monetita no se observó en los cementos de brushita libres de estroncio ni en los cementos de brushita modificados con estroncio y 2.16% (peso/peso) pirofosfato sódico. La monetita es estable a pH ácido y su formación indica exceso de acidez en la matriz del cemento [130].

Tabla 1. Análisis de Rietveld de los cementos de brushita modificados con SrCl_2 y pirofosfato sódico.

% SrCl_2 (peso/peso)	% P_2O_7 (peso/peso)	DCPD %	β -TCP %	DCPA %
0	1.08	95	5	-
0	2.16	90	10	-
0	3.24	89	11	-
0	4.32	89	11	-
5	0	99	1	-
5	0.54	87	5	8
5	1.08	86	6	8
5	2.16	90	10	-
10	1.08	66	7	27
10	2.16	90	10	-

El incremento en la concentración de iones de estroncio provocó el aumento de los parámetros de la celdilla de cristal de brushita (Tabla 2). Este incremento se debe al tamaño más grande del ión de estroncio Sr^{2+} (radio = 1.13 Å) que el ión de calcio Ca^{2+} (radio = 1.00 Å). Así, el incremento en el volumen de la celdilla del cristal indica la incorporación de los iones de estroncio en el cristal brushita sustituyendo los iones de calcio. Los iones de estroncio Sr^{2+} distorsionan la red del cristal de brushita causando su expansión.

Tabla 2. Parámetros de la celdilla del cristal de brushita.

% SrCl ₂	%P ₂ O ₇	Parámetros de la celdilla de DCPD				
		<i>a</i> (Å)	<i>b</i> (Å)	<i>c</i> (Å)	<i>β</i> (°)	<i>Volumen</i> (Å ³)
0	1.08	6.363881	15.18694	5.812595	118.5254	423.94
	2.16	6.365469	15.18514	5.810992	118.5327	421.18
5	0	6.363328	15.18824	5.812309	118.5302	422.15
	1.08	6.368801	15.19015	5.814294	118.5022	432.93
	2.16	6.372349	15.19572	5.814715	118.5006	433.94
10	0	6.370871	15.19321	5.814456	118.4933	436.35
	1.08	6.374945	15.20379	5.817653	118.4932	437.21
	2.16	6.375813	15.19972	5.815895	118.4758	443.12

Cabe mencionar que los cementos de brushita modificados con pirofosfato a concentraciones $\geq 2.16\%$ (peso/peso) presentaban una superficie brillante en la interfase aire-sólido. Esta superficie es diferente que las superficies en contacto con la pared del molde o la matriz del cemento. Se investigó la estructura de la superficie brillante mediante la técnica FTIR y la difracción de rayos X por incidencia rasante ya que la geometría convencional de Bragg-Brent de la difracción de rayos X no es adecuada para estudiar la estructura de la superficie debido a las interferencias del resto del material. Como se puede observar en la figura 11, la superficie brillante esta compuesta de una fracción grande de fase amorfa y otra fracción cristalina principalmente de fosfato tricálcico- β .

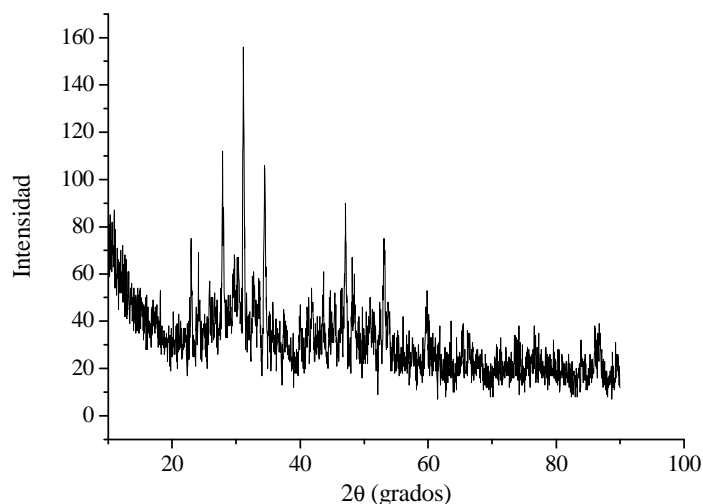


Figura 11. Diagrama de difracción de rayos X de la superficie brillante del cemento de brushita modificado con 5% SrCl_2 y 4.32% pirofosfato.

Con la técnica FTIR se pudo observar una banda de vibración a número de onda de 720 cm^{-1} en el espectro de la superficie brillante. Esta banda es característica de vibración de tensión del enlace P-O-P indicando la presencia de pirofosfato cálcico dihidratado en la fase amorfa (Figura 12).

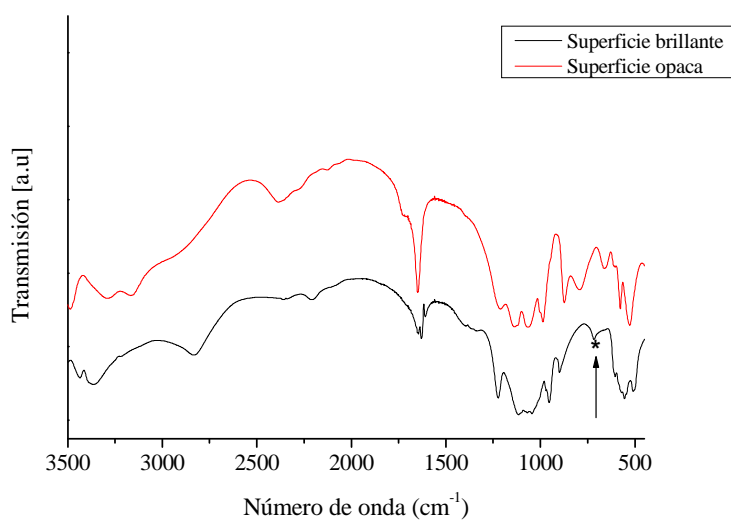


Figura 12. Espectros FTIR de la superficie brillante y opaca del cemento de brushita modificado con pirofosfato sódico 4.32%. (*) La banda de vibración del grupo P-O-P a 720 cm^{-1} .

Se estudió también la morfología de los cementos fraguados con microscopia electrónica de barrido (SEM). Se pudieron apreciar diferentes morfologías de los cristales de la superficie de rotura de de los cementos modificados con 5% SrCl_2 y 0.54% (figura 13) o 2.16% (figura 14) de pirofosfato. Los cristales fueron irregulares en forma y tamaño y se pudo identificar unos clústeres de cristales (Figura 13); los cristales individuales tenían distintas formas: prismáticas con una longitud media de $3.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$ y anchura media de $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, cristales circulares pequeñas de un diámetro medio de $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ y cristales en forma de placa con una longitud media de $5 \pm 2 \mu\text{m}$ y anchura de $3 \pm 1 \mu\text{m}$. (Figura 14).

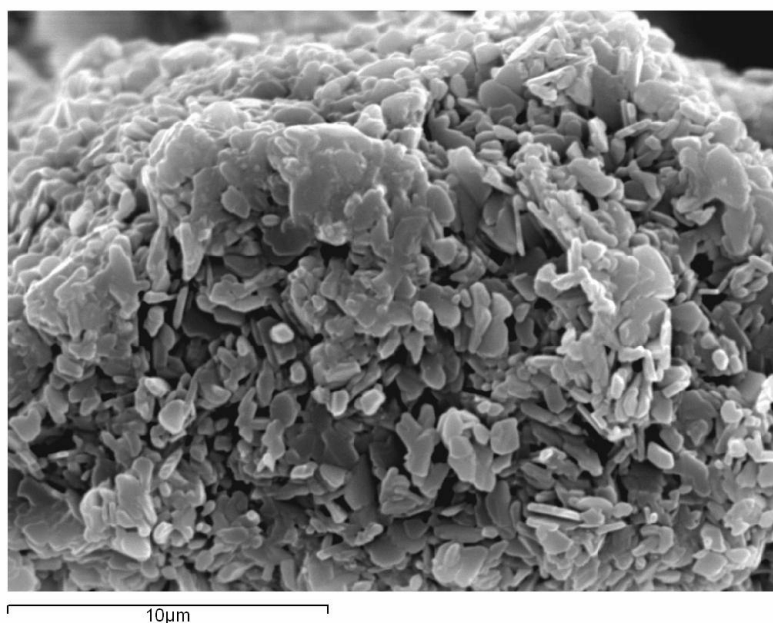


Figura 13. Imagen de microscopia electrónica de barrido de la superficie de rotura de cemento de brushita modificado con 5% SrCl_2 y 0.54% pirofosfato sódico.

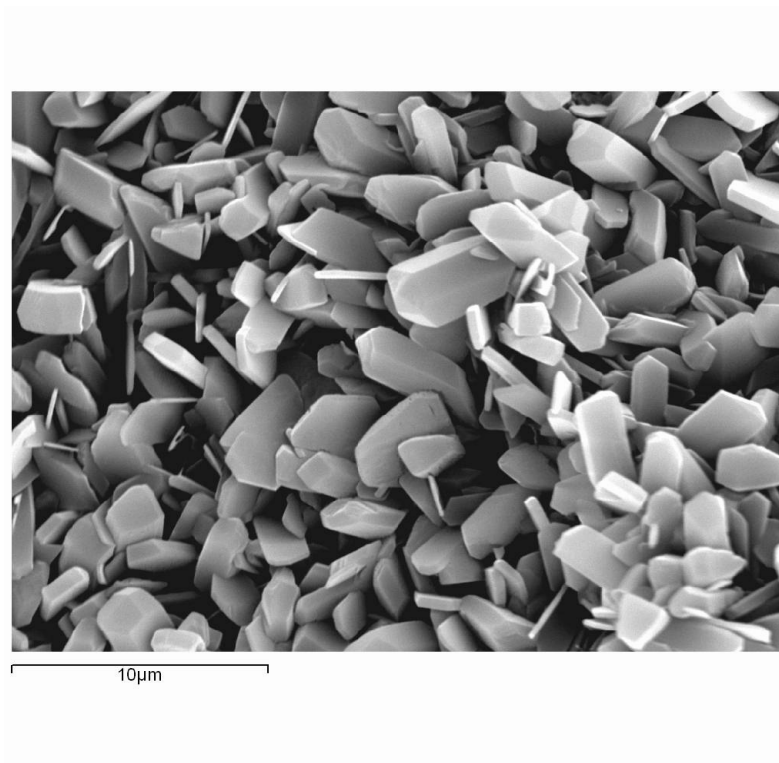


Figura 14. Imagen de microscopia electrónica de barrido de la superficie de fractura de cemento de brushita modificado con 5% SrCl₂ y 2.16% pirofosfato sódico.

8.2.1.2 Discusión

La celdilla de del cristal de brushita consta de 4 átomos de calcio y 4 átomos de fósforo [203] que se unen dando como resultado placas rugosas. Dos moléculas de agua unen dos placas. Todos los sitios de Ca en el cristal de brushita se caracterizan por coordinaciones casi idénticas [188]. Lo que implica que los átomos de Sr pueden ocupar todos los sitios de Ca en el cristal de brushita. Así, los cementos bio-reabsorbibles de brushita pueden funcionar como sistemas portadores de estroncio.

La mineralización en los sistemas biológicos esta altamente regulado en función de los parámetros del tiempo y la localización. El pirofosfato inorgánico es un inhibidor potente y directo de la cristalización en los tejidos conjuntivos, el tracto urinario y los fluidos extracelulares [235-237]. Se añaden los iones de pirofosfato al dentífrico dental para inhibir la formación de cálculo dental [127]. Así, la exclusión local o la degradación [238] del pirofosfato inorgánico parece ser necesario para la mineralización en estructuras delimitadas de la membrana celular de los osteoblastos y condrocitos denominadas vesículas matriciales [235]. La implantación *in vivo* de pirofosfato cálcico- β ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) resultó en la unión directa con el tejido óseo sin la formación de tejido blando intermedio [239]. Las figuras 1 y 7 muestran que el uso separado o simultáneo de los iones de estroncio y de pirofosfato inhibió la reacción de fraguado del cemento. Los iones de pirofosfato inhiben el crecimiento del cristal de brushita y la disolución del fosfato tricálcico- β . Se ha reportado que los iones de estroncio inhiben la disolución de la hidroxiapatita y la precipitación de fosfatos cálcicos [127 y 189]. Por lo que su presencia podría inhibir la reacción de fraguado del cemento de brushita.

Sin embargo, la figura 7 muestra la disminución del tiempo de fraguado final de cemento de brushita con concentraciones de $\text{SrCl}_2 \geq 5\%$ (peso/peso) y de pirofosfato sódico $\geq 2.16\%$ (peso/peso). El tiempo de fraguado final disminuyó a concentración de pirofosfato de 5.4% (peso/peso) en cemento de brushita libre de estroncio. Este comportamiento se puede relacionar con la precipitación de pirofosfato cálcico dihidratado en fase amorfa (Figuras 11 y 12). Este material puede actuar como centro de nucleación para el crecimiento de los cristales de brushita y así acelera la reacción de fraguado del cemento. Se ha reportado que concentraciones de sulfato mayores que 0.1M resultaron en tiempos de fraguado mas cortos de cementos de brushita ya que la formación de sulfato cálcico dihidratado actúa como núcleo para el crecimiento de

brushita acelerando la reacción de fraguado [126 y 131]. Además, la hidrólisis del enlace P-O-P en los iones de pirofosfato produce dos iones de ortofosfato [220]. Esta hidrólisis puede aumentar significativamente la concentración de los iones de ortofosfato acelerando la reacción de fraguado del cemento.

En los cementos libres de estroncio, el aumento de la concentración de los iones de pirofosfato resultó en valores más altos de la tensión diametral (Figura 7). Se ha reportado que el aumento en la concentración de los iones de pirofosfato mejoró la fuerza de tensión diametral de los cementos de brushita. [126 y 131]. Este aumento es paralelo al aumento del tiempo de fraguado, así atribuimos esta mejora en la tensión diametral al crecimiento más lento de los cristales de brushita resultando en cristales de tamaño más pequeño permitiendo mejor compactación de los cristales.

Los valores de la tensión diametral son mejores en cementos de brushita modificados con SrCl_2 5% (peso/peso) que cementos modificados con SrCl_2 10% (peso/peso) (Figuras 2 y 8). El tamaño de la celdilla del cristal de brushita es mayor en cemento con SrCl_2 10% (peso/peso) que con SrCl_2 5% (peso/peso) (Figura 5 y Tabla 2). Como el radio iónico de Sr^{2+} (1.13 Å) es mayor que el radio iónico de Ca^{2+} (1.00 Å), el aumento en el tamaño de la celdilla indica la incorporación del estroncio en los cristales de brushita. Así, la sustitución iónica de calcio por estroncio expande y desestabiliza los cristales de brushita. Los defectos menores que la inclusión de iones de Sr^{2+} provoca pueden explicar los valores mas altos de la fuerza de tensión diametral de los cementos con SrCl_2 5% (peso/peso).

A concentraciones de SrCl_2 de 5% y 10% (peso/peso), la tensión diametral del cemento aumenta a concentraciones del pirofosfato $\leq 2.16\%$ (peso/peso). Sin embargo, la tensión diametral disminuyó significativamente a concentraciones más altas del pirofosfato (Figura 8). Esta rebaja en la tensión diametral se puede relacionar con los tiempos de fraguado más cortos resultando en cristales de brushita más grandes afectando su compactación. Además, la transformación de brushita a monetita (Tabla 1) puede desminuir la tensión diametral del cemento. Dado que la monetita es más densa que la brushita, esta transformación puede aumentar la porosidad del cemento de brushita afectando negativamente la tensión diametral del cemento [240].

Anteriormente, hemos mostrado que la perdida de peso sólido sirve para evaluar la cohesión de cementos de brushita. La pérdida de peso sólido aumenta con el aumento de

la concentración de SrCl_2 (Figura 3 y 9). La sustitución iónica de los iones de calcio por iones de estroncio expande y desestabiliza los cristales de brushita aumentando su disolución. Como regla general, cuando más largo es el tiempo de fraguado de un cemento, será peor su cohesión [102]. Así, los cementos de brushita con pirofosfato sódico (2.16% (peso/peso) y concentraciones de $\text{SrCl}_2 > 5\%$ (peso/peso) tienen un tiempo de fraguado menor y les corresponden los valores más bajos de pérdida de peso sólido (Figura 9). Además, el pirofosfato cálcico dihidratado es poco soluble en agua (producto de la solubilidad = $2 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ a 25°C) y precipita en la superficie de los cementos con concentración de pirofosfato $\geq 2.16\%$ (peso/peso) disminuyendo la liberación de partículas de fosfato tricálcico- β .

8.2.2 Cementos óseos de fosfato cálcico preparados con β -TCP sustituido por estroncio

8.2.2 Cementos óseos de fosfato cálcico preparados con β -TCP sustituido por estroncio

El método anterior de inducir la sustitución iónica de calcio por estroncio está asociado a problemas de un tiempo de fraguado muy elevado que limita la concentración empleada de SrCl_2 y el porcentaje de la sustitución iónica en el cristal de brushita.

Por eso, se ha sintetizado fosfato tricálcico- β sustituido parcialmente por estroncio utilizando el método descrito en la sección 7.1. Se han descrito otros métodos para sustituir el calcio por estroncio en el β -TCP. En un estudio anterior se sintetizó β -TCP sustituido por estroncio mediante reacción en estado sólido de unas mezclas de distintas proporciones de β -TCP y $\alpha\text{-Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ [232]. Kannan et al introdujeron los iones de Sr^{2+} en el cristal β -TCP mediante la precipitación química [241]. En este método, se precipitó CDHA con contenido de estroncio que varía entre 0% y 26.26% (peso/peso) y a continuación se sintetizó β -TCP sustituido por estroncio calentando la CDHA a temperaturas entre 700-1100 °C.

8.2.2.1 Resultados

Análisis estructural del fosfato tricálcico- β

Los picos en los diagramas de difracción de rayos X del Sr- β -TCP sufrieron un desplazamiento hacia ángulos de difracción más bajos en comparación con el patrón del β -TCP. Este desplazamiento aumentó con el incremento del contenido de estroncio en Sr- β -TCP (Figura 1). Además se puede observar que la intensidad de los picos correspondientes a ángulos de difracción de 25.92° y 34.5° aumentó con el incremento del contenido de estroncio. Estos ángulos corresponden a los planos del cristal 1010 y 220. Lo que indica una dirección de crecimiento preferente en estos planos de los cristales de Sr- β -TCP, especialmente para el 33.3%-Sr- β -TCP (Figura 1). La exploración de los espectros FTIR de los β -TCP muestra una degeneración en las bandas de vibración del grupo PO_4^{3-} y un desplazamiento hacia bajas frecuencias. Estos cambios aumentan con el incremento de la sustitución iónica en el β -TCP (Figura 2).

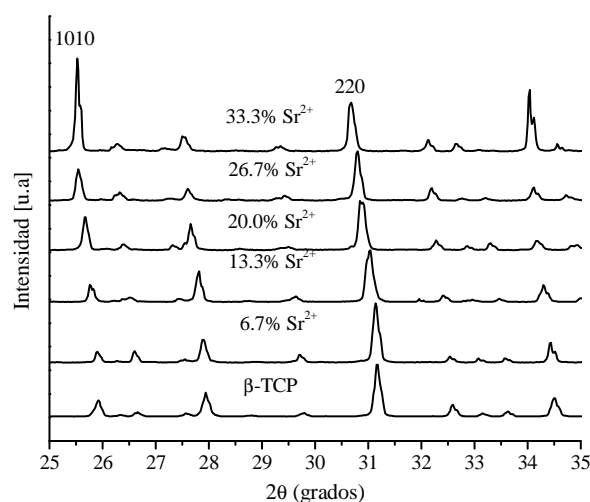


Figura 1. Diagramas de difracción de rayos X de los fosfatos tricalcicos- β sustituido parcialmente por estroncio. El contenido de iones de Sr^{2+} es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

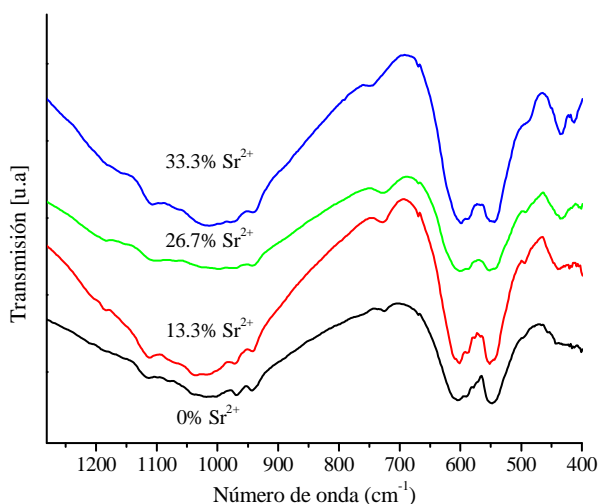


Figura 2. Espectros FTIR de fosfato tricálcico- β sustituido por estroncio.

Apartir de los diagramas de difracción de rayos X se pueden calcular los parámetros de la celdilla cristalina y el crecimiento de la misma. Se observa un incremento casi lineal del parámetro b de la celdilla del cristal de β -TCP a todos los porcentajes de la sustitución iónica. Mientras que el parámetro a no sufre más cambios a porcentajes de sustitución iónica mayores de 20% (Figura 3). El radio iónico del estroncio (1.13 Å) más grande que el radio del ión de calcio (1.00 Å) provoca el aumento de los parámetros cristalinos.

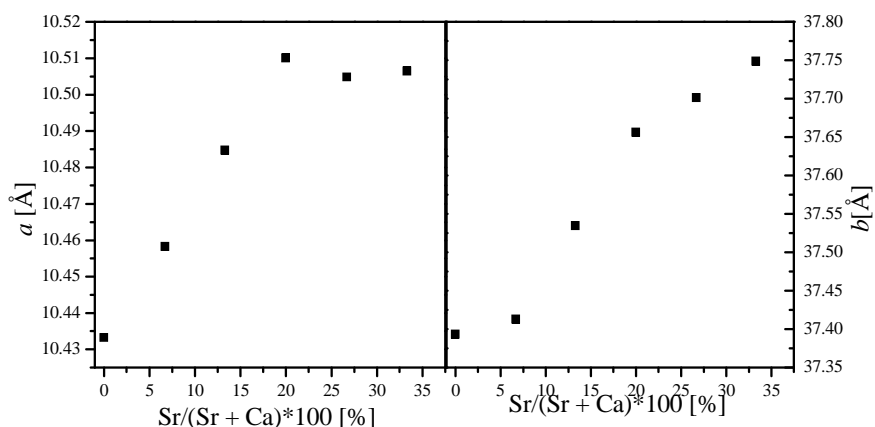


Figura 3. Parámetros de la celdilla del cristal, a y b , de los fosfatos tricálcicos- β . El contenido de iones de Sr^{2+} es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

Análisis estructural de COFC fraguado

Estos cementos modificados con Sr^{2+} se prepararon según el sistema $\beta\text{-TCP} + \text{MCP} + \text{H}_2\text{O}$ en una relación P/L de 3. El contenido de Sr^{2+} en los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%. El diagrama de difracción de rayos X del cemento de brushita preparado con $\beta\text{-TCP}$ reveló que la matriz del cemento está compuesta principalmente de brushita y $\beta\text{-TCP}$ no reaccionado (Figura 4). Mientras, los diagramas de los cementos preparados con $\text{Sr-}\beta\text{-TCP}$ mostraron que la matriz del cemento está constituida principalmente de brushita, monetita y $\text{Sr-}\beta\text{-TCP}$ no reaccionado. Sin embargo, la cantidad del $\text{Sr-}\beta\text{-TCP}$ no reaccionado disminuyó con el incremento de la sustitución iónica por estroncio, lo que se manifiesta en la ausencia de picos característicos del $\beta\text{-TCP}$ en los diagramas de difracción de los cementos preparados con $\text{Sr-}\beta\text{-TCP}$ de alto contenido de estroncio (Figura 4). Además, la presencia de monetita en la matriz del cemento aumentó con el aumento del contenido de estroncio en el $\text{Sr-}\beta\text{-TCP}$ hasta formar la fase cristalina principal en el cemento fraguado con 26.7% y 33.3%- $\text{Sr-}\beta\text{-TCP}$ tal como se muestra en la figura 4.

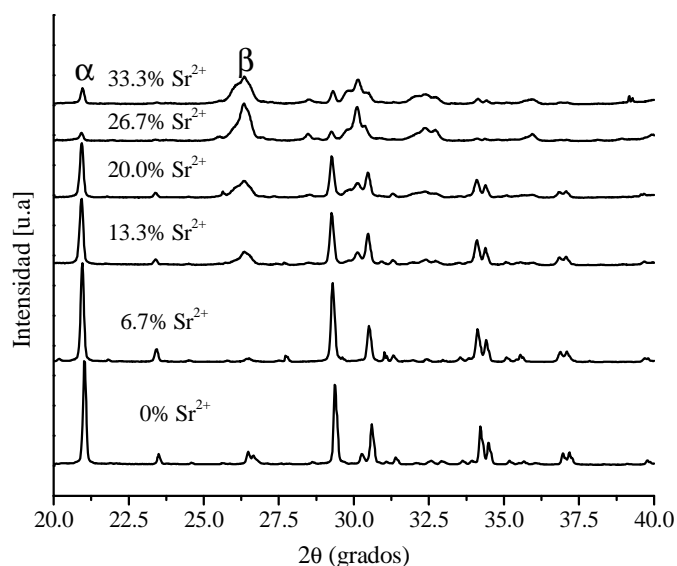


Figura 4. Diagramas de difracción de rayos X de los cementos preparados según el sistema $\beta\text{-TCP} + \text{MCP} + \text{H}_2\text{O}$. El contenido de estroncio en los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%. α y β indican los picos característicos de brushita y monetita, respectivamente.

Los picos característicos de brushita y monetita sufrieron un desplazamiento hacia ángulos de difracción más bajos con el incremento del contenido de estroncio en Sr- β -TCP (Figura 4). Lo que significa un aumento del volumen de la celdilla del cristal de brushita y monetita indicando la sustitución de los iones del calcio por iones de estroncio en los cristales de brushita y monetita. Así, el uso de Sr- β -TCP en la producción del COFC funcionó como método para inducir la sustitución iónica en los cristales de brushita y monetita.

El uso del ácido cítrico (0.1M, 0.3M y 0.5M) para fraguar el cemento preparado con 33.3%-Sr- β -TCP aumentó la intensidad de los pico de brushita y disminuyó los pico de monetita en los diagramas de difracción de rayos X (Figura 5).

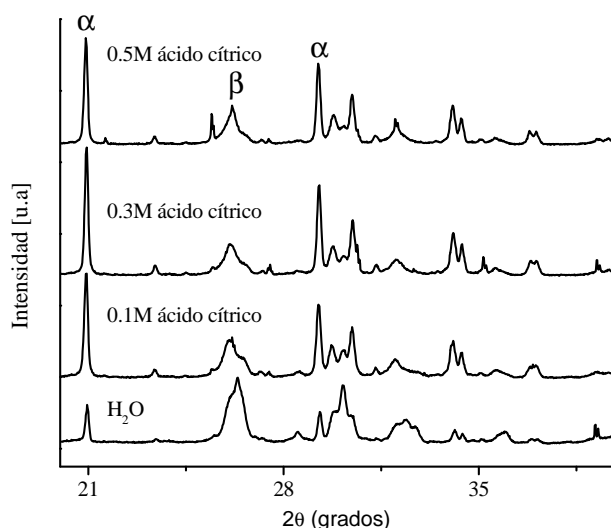


Figura 5. Diagramas de difracción de los cementos preparados con 33.3%-Sr- β -TCP y fraguados con agua o ácido cítrico de 0.1M, 0.3M y 0.5M. α y β indican los picos característicos de brushita y monetita, respectivamente.

Cambios en el pH y la temperatura durante la reacción de fraguado

La reacción de fraguado del cemento de brushita es exotérmica. La figura 6 muestra la temperatura de fraguado del cemento en función del tiempo. Se pueden dividir las curvas en tres regiones. La primera región se caracteriza por un aumento rápido de la

temperatura, la segunda por un plateau a temperaturas máximas y la tercera por un decaimiento lento de la temperatura (Figura 6).

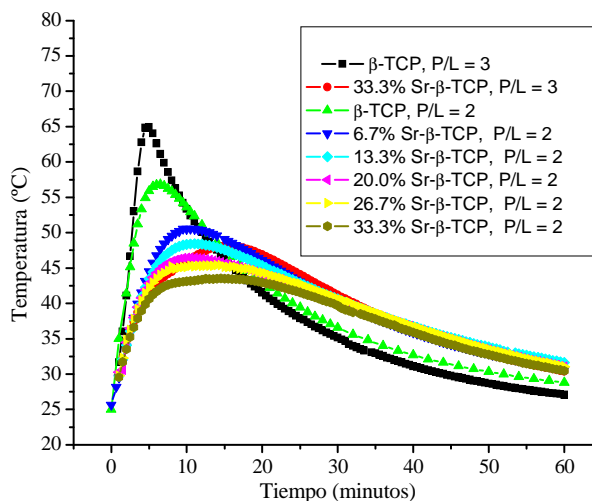


Figura 6. Temperatura de fraguado de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H_2O . El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

Esta característica de las curvas se mantuvo en la reacción de fraguado de los cementos preparados con β -TCP, 6.7%-Sr- β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP, 20.0%-Sr- β -TCP, 26.7%-Sr- β -TCP y 33.3%-Sr- β -TCP. La reacción de fraguado tardó más tiempo en llegar al plateau de máximas temperaturas (la curva está desplazada a la derecha), las temperaturas se rebajaron, y la región del plateau se aplanó al aumentar el contenido de estroncio. El aumento de la relación P/L de 2 a 3 mantuvo estas diferencias, sin embargo, la velocidad de calentamiento, las máximas temperaturas y la velocidad de la disminución de las temperaturas fueron más altos a relación P/L de 3 (desplazamiento de la curva de la temperatura hacia la izquierda) (Figura 6). Esto puede deberse a que hay menos volumen del cemento a calentar cuando la relación P/L es mayor.

Cuando se mezclaron la fase sólida y la fase líquida del cemento, empezó a subir rápidamente el pH de la pasta del cemento hasta llegar a un primer plateau (Figura 7). A continuación el pH volvió a subir hasta llegar a un máximo. Después, el pH de la pasta del cemento preparado con β -TCP tardó 10 minutos en llegar a un segundo mínimo pH con una diferencia de 0.14 con respecto a la máxima pH (Figura 7). Este tiempo fue de

16 minutos para una diferencia de pH de 0.45 para la pasta preparada con 13.3%-Sr- β -TCP. La pasta del cemento fraguado con 33.3%-Sr- β -TCP necesitó 38 minutos para conseguir una diferencia de 0.56. El pH del segundo plateau fue 5.46, 4.70 y 4.74 para los cementos fraguados con β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP y 33.3%-Sr- β -TCP, respectivamente (Figura 7).

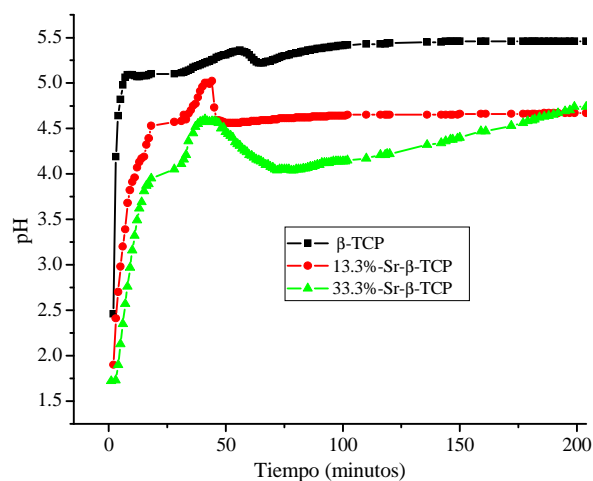


Figura 7. pH de la reacción de fraguado de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H₂O. El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 13.3% y 33.3%.

Tiempo de fraguado final

Los β -TCP sustituidos por estroncio aumentaron significativamente el FST de los cementos obteniéndose unos valores que cumplen con los requisitos para su aplicación clínica (Figura 8). El FST aumentó desde 2.2 minutos para el cemento fraguado con β -TCP a 4-5 minutos para los cementos fraguados con Sr- β -TCP. La reacción de fraguado fue acelerada cuando los cementos fraguaron a 37 °C y humedad relativa > 90%. En estas condiciones los cementos fraguaron en 1-2 minutos (Figura 8).

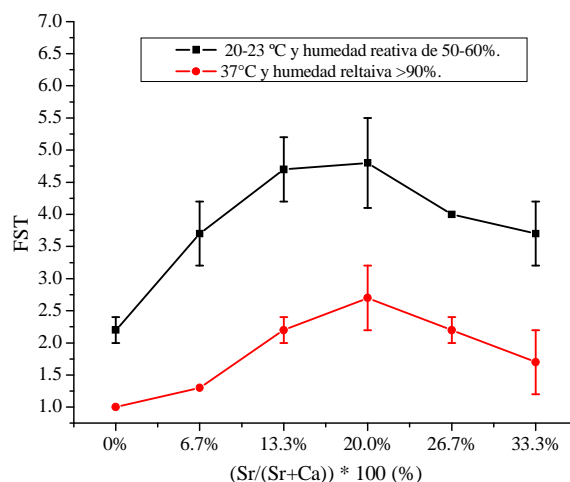


Figura 8. Tiempo de fraguado final de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H₂O. El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

7.2.2.5 La fuerza de compresión y la porosidad de COFC:

La figura 9 muestra que los Sr- β -TCP no afectaron la fuerza de compresión de los cementos preparados según el sistema β -TCP-MCP-H₂O. Además, una mejora en la fuerza de compresión fue medida para los cementos preparados según el sistema β -TCP + H₃PO₄ + H₂O (Figura 9) dónde se alcanzó un valor de 13 ± 2 MPa en el cemento preparado con 20%-Sr- β -TCP. La preparación de los cementos con una relación P/L de 5 alcanzó unos valores de la fuerza de compresión de 9 ± 1 MPa y 17 ± 3 MPa para los cementos preparados con β -TCP y 33.3%-Sr- β -TCP, respectivamente (Figura 9).

Los cálculos de la porosidad relativa no mostraron diferencias significativas entre los cementos preparados con β -TCP y los cementos preparados con Sr- β -TCP (Tabla 1), aunque sí en el tamaño de poro. El diámetro medio de los poros en los cementos preparados con β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP, 26.7%-Sr- β -TCP y 33.3%-Sr- β -TCP es de 146, 289, 239 y 621 nm, respectivamente. El 96% de los poros en el cemento preparado con β -TCP tienen un diámetro entre 4-1400 nm frente a 88% de los poros en los cementos modificados con estroncio (Figura 10).

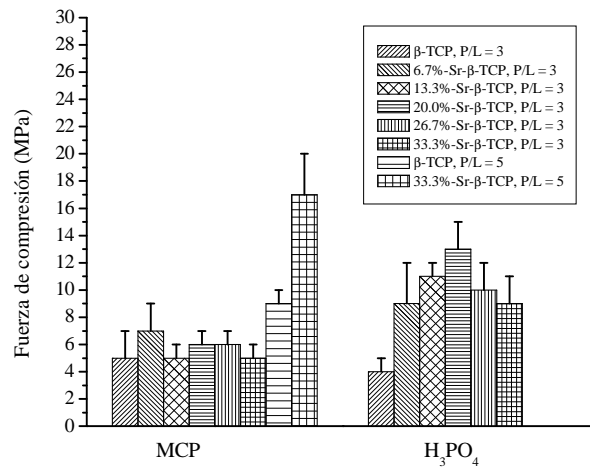


Figura 9. Fuerza de compresión de los cementos preparados según los sistemas β -TCP + MCP + H₂O y β -TCP + H₃PO₄ + H₂O. El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

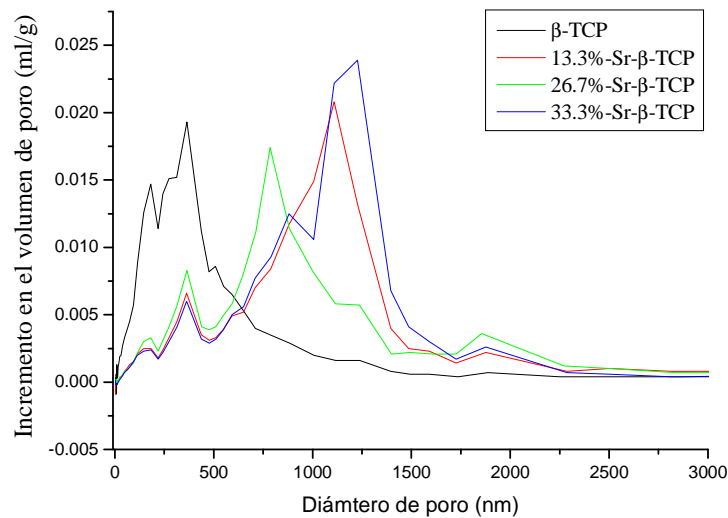


Figura 10. Incremento en el volumen de poro de los cementos preparados con β -TCP, y con 13.3%, 26.7% y 33.3%-Sr- β -TCP en función de diámetro de poro. Las medidas se han realizado en porosímetro de mercurio.

Tabla 1. Densidad y porosidad relativa de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H₂O. El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

COFC preparado con Sr- β -TCP	Densidad aparente	Densidad absoluta	Porosidad relativa
β -TCP	1.37 ± 0.07	2.82 ± 0.01	51.39 ± 0.05
6.7% -Sr- β -TCP	1.31 ± 0.03	2.75 ± 0.05	52.42 ± 0.03
13.3% -Sr- β -TCP	1.30 ± 0.07	2.72 ± 0.03	52.24 ± 0.06
20% -Sr- β -TCP	1.35 ± 0.04	2.64 ± 0.07	48.87 ± 0.04
26.7% -Sr- β -TCP	1.40 ± 0.05	2.96 ± 0.02	52.90 ± 0.04
33.3% -Sr- β -TCP	1.46 ± 0.06	2.97 ± 0.03	50.89 ± 0.04

Radiopacidad de los COFC

La sustitución iónica por estroncio aumentó la radiopacidad de los cementos de brushita y monetita (Figura 11). La radiopacidad de los COFC preparados con 20.0%, 26.7% y 33.3%-Sr- β -TCP fue igual a una lamina de aluminio de 3mm de espesor (Figura 11) mientras que la radiopacidad de los cementos fraguados con β -TCP fue igual a una lamina de aluminio de 1mm en espesor.

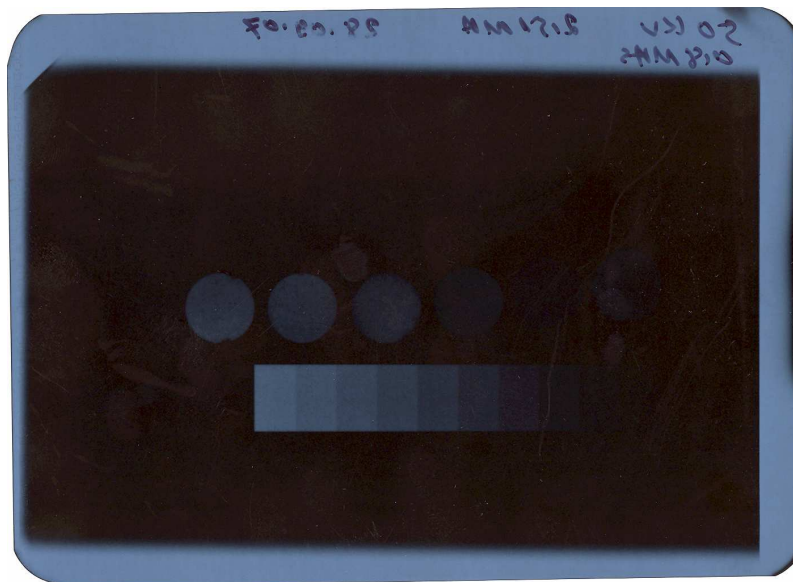


Figura 11. Radiopacidad de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H₂O. El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de, derecha a izquierda, 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%.

Experimentos de la liberación de Sr^{2+} y el envejecimiento de COFC

Se investigó el efecto del envejecimiento de las muestras de COFC en modo estático y también en modo dinámico. La figura 12 muestra que la concentración de iones de calcio en el medio incubador (agua bidestilada) fue máxima después de 24 h para todos los cementos. Las máximas concentraciones fueron más altas para los cementos preparados con Sr- β -TCP. El cemento preparado con 6.7%-Sr- β -TCP tuvo la máxima mas alta seguido por el cemento preparado con 20.0%-Sr- β -TCP. El cemento preparado con 33.3%-Sr- β -TCP liberó más iones de calcio después de 48 h de la incubación. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas después de 8 días de la incubación. La concentración de iones de Ca^{2+} varía entre 40 y 80 ppm para todos los cementos.

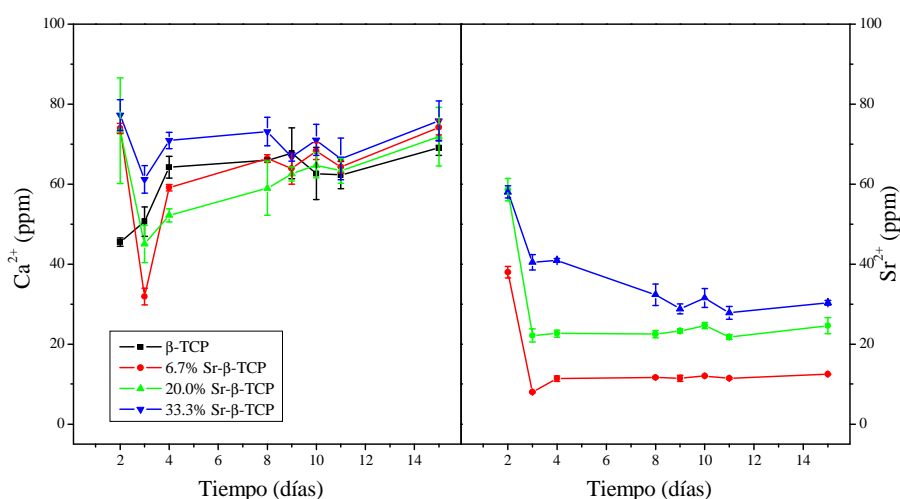


Figura 12. Liberación de los iones de Ca^{2+} y Sr^{2+} al medio incubador de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H_2O . El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 20.0% y 33.3%.

La liberación de los iones de Sr^{2+} fue mínima para el cemento preparado con 6.7%-Sr- β -TCP. Las diferencias en la liberación de iones de estroncio no fueron significativas después de 24 h entre los cementos preparados con 20.0% y 33.3% Sr- β -TCP. Mientras que la liberación de iones Sr^{2+} es proporcional y se puede relacionar con el contenido de estroncio en los cementos en tiempos de incubación más largos. El cemento preparado con 33.3%-Sr- β -TCP libera más iones de estroncio que los demás cementos seguido por

el cemento preparado con 20.0%-Sr- β -TCP y después por el cemento preparado con 6.7%-Sr- β -TCP (Figura 12).

El perfil de la liberación de iones de Sr^{2+} consta de una ráfaga inicial de iones Sr^{2+} seguido por una liberación constante a lo largo de un periodo de observación de 14 días. Esto parece indicar una cinética de liberación de grado cero. La concentración de iones de Sr^{2+} varía desde *ca.* 10 ppm para el cemento preparado con 6.7%-Sr- β -TCP a 30 ppm para el cemento preparado con 33.3%-Sr- β -TCP.

En la figura 13 se muestra el efecto del envejecimiento dinámico en la composición de los COFC. Los diagramas de difracción de rayos X muestran la presencia de HA y monetita en la matriz del cemento preparado con β -TCP. Mientras que los diagramas de los cementos preparados con Sr- β -TCP muestran un aumento en la intensidad de los picos característicos de brushita y una disminución en los pico de monetita. La HA no fue detectada en la matriz de los cementos preparados con Sr- β -TCP indicando que este componente tiene un efecto inhibitor de la transformación de brushita a HA (Figura 13).

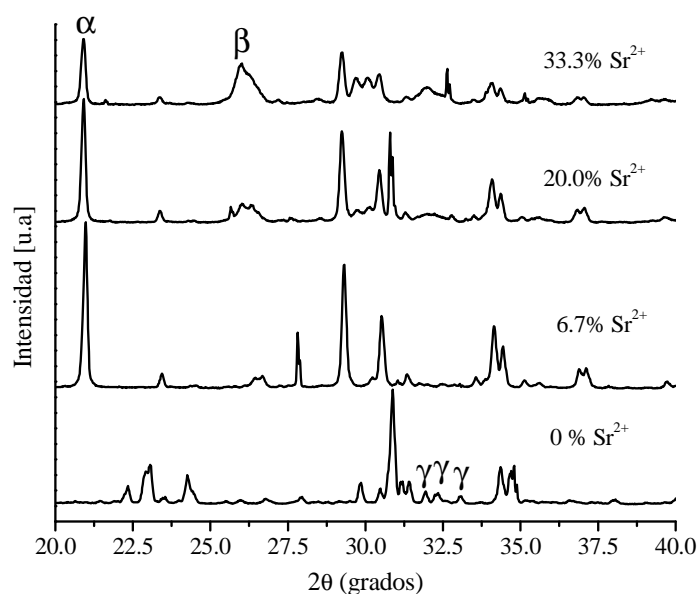


Figura 13. Efecto del envejecimiento dinámico en los diagramas de difracción de rayos X de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H_2O . El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 20.0% y 33.3%. α , β y γ indican los picos característicos de brushita, monetita y hidroxiapatita, respectivamente.

Los cambios estructurales fueron diferentes cuando se envejecieron las muestras en modo estático. Los diagramas de difracción de rayos X revelan un aumento en la intensidad de los picos característicos de monetita y disminución en la intensidad de los picos de brushita. Se encontró que el cemento preparado con 26.7%-Sr- β -TCP está totalmente formado por monetita (Figura 14).

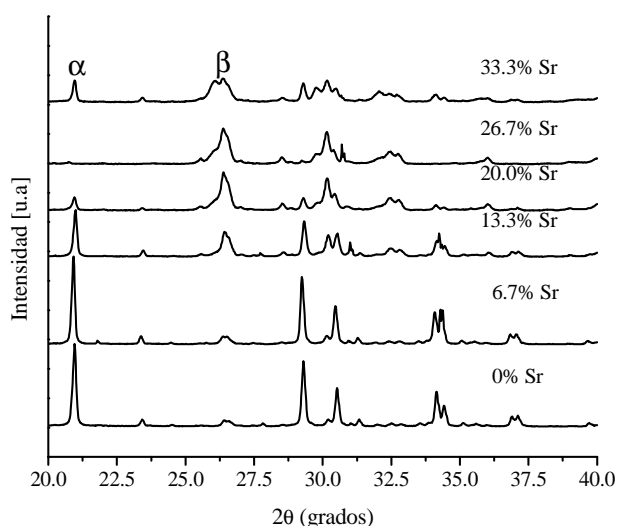


Figura 14. Efecto del envejecimiento estático en los diagramas de difracción de rayos X de los cementos preparados según el sistema β -TCP + MCP + H₂O. El contenido de estroncio de los fosfatos tricalcicos- β es de 0%, 6.7%, 13.3%, 20.0%, 26.7% y 33.3%. α y β indican los picos característicos de brushita y monetita, respectivamente.

Prueba de la biocompatibilidad de COFC

Para estudiar la biocompatibilidad de los cementos preparados con Sr se procedió a realizar estudio *in vitro* cultivando osteoblastos en la superficie de estos cementos. El estudio de la morfología de los osteoblastos cultivados en la superficie del cemento muestra que las células fueron adaptándose a la superficie de los cementos después de 3 días de cultivo como se muestran las figuras 15-17. Las células adheridas a la superficie del cemento tuvieron dos formas; una forma redondeada en proceso de extensión proyectando filopodias y otra forma alargada, plana y extendida dónde se pueden diferenciar bien las filopodias. Tal como se muestra en las figuras 18 a 20, después de 7 días de cultivo los osteoblastos cubrieron toda la superficie de los cementos.

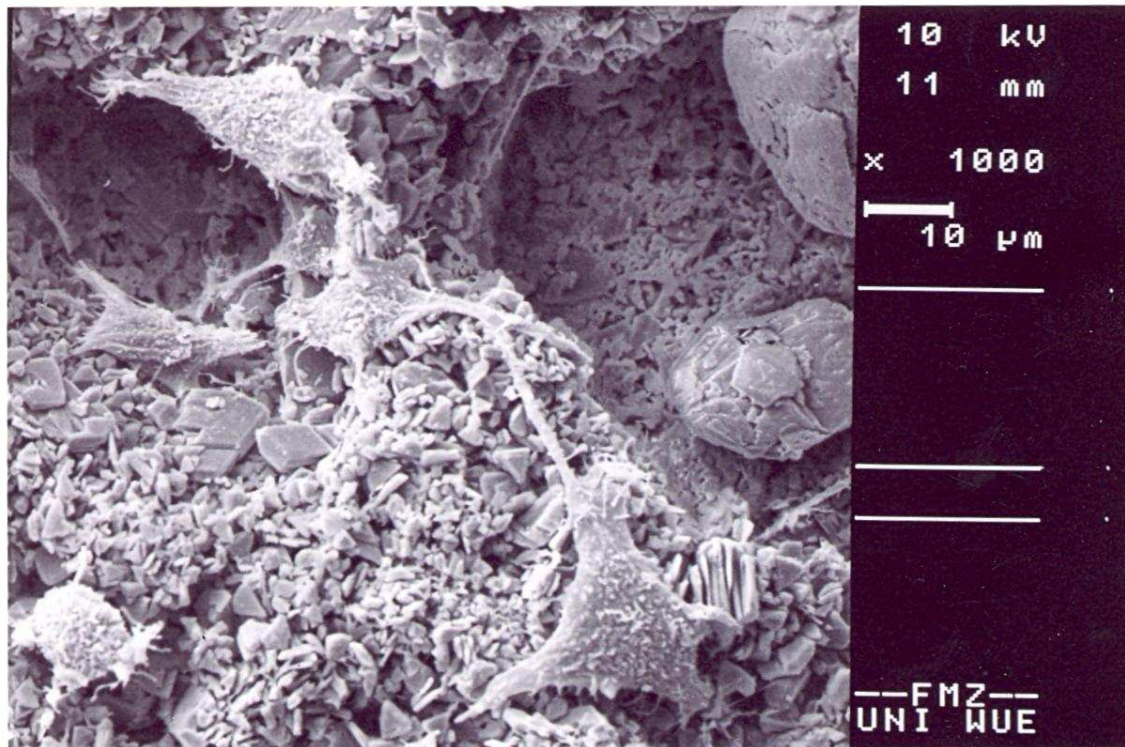


Figura 15. Imagen SEM de los osteoblastos cultivados en la superficie del COFC preparado con β -TCP después de 3 días de cultivo.

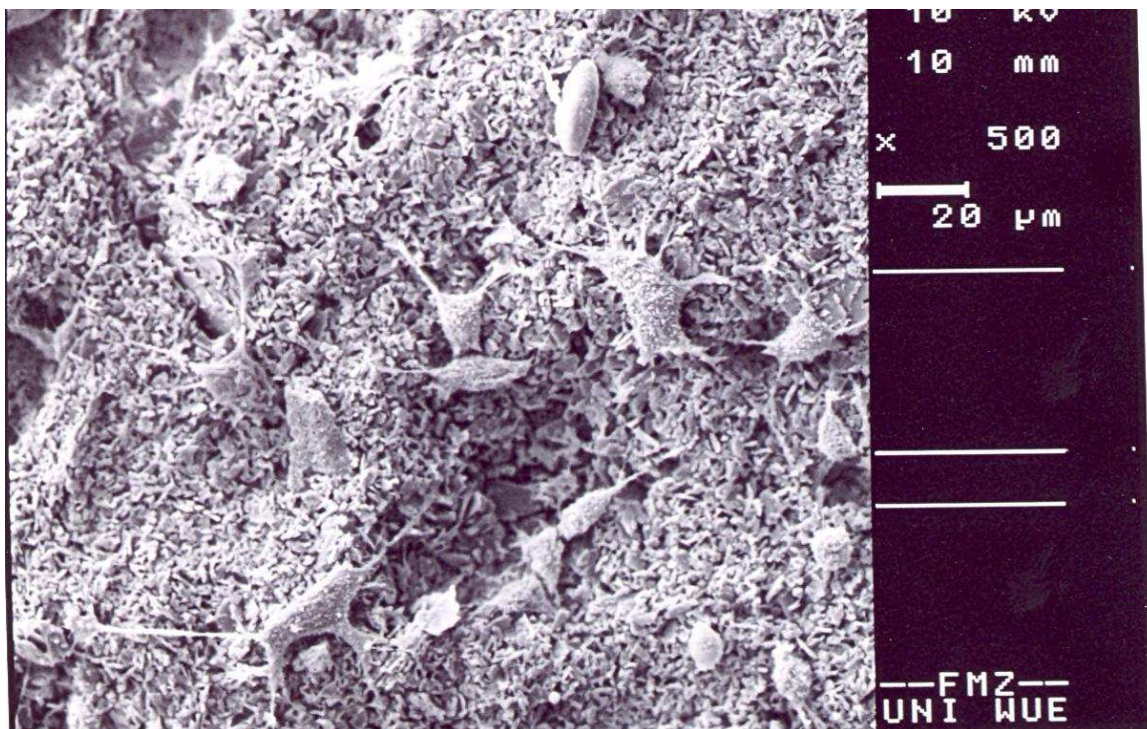


Figura 16. Imagen SEM de los osteoblastos cultivados en la superficie del COFC preparado con 13.3%-Sr- β -TCP después de 3 días de cultivo.

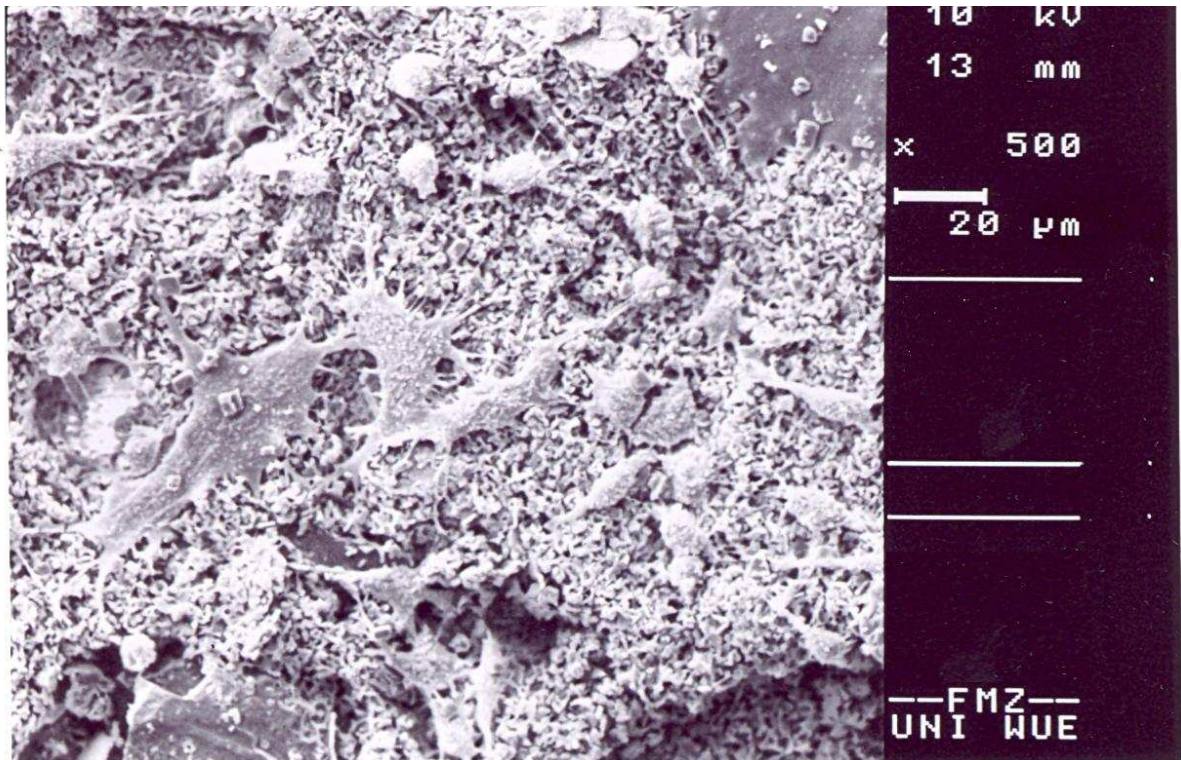


Figura 17. Imagen SEM de los osteoblastos cultivados en la superficie del COFC preparado con 33.3%-Sr-β-TCP después de 3 días de cultivo.

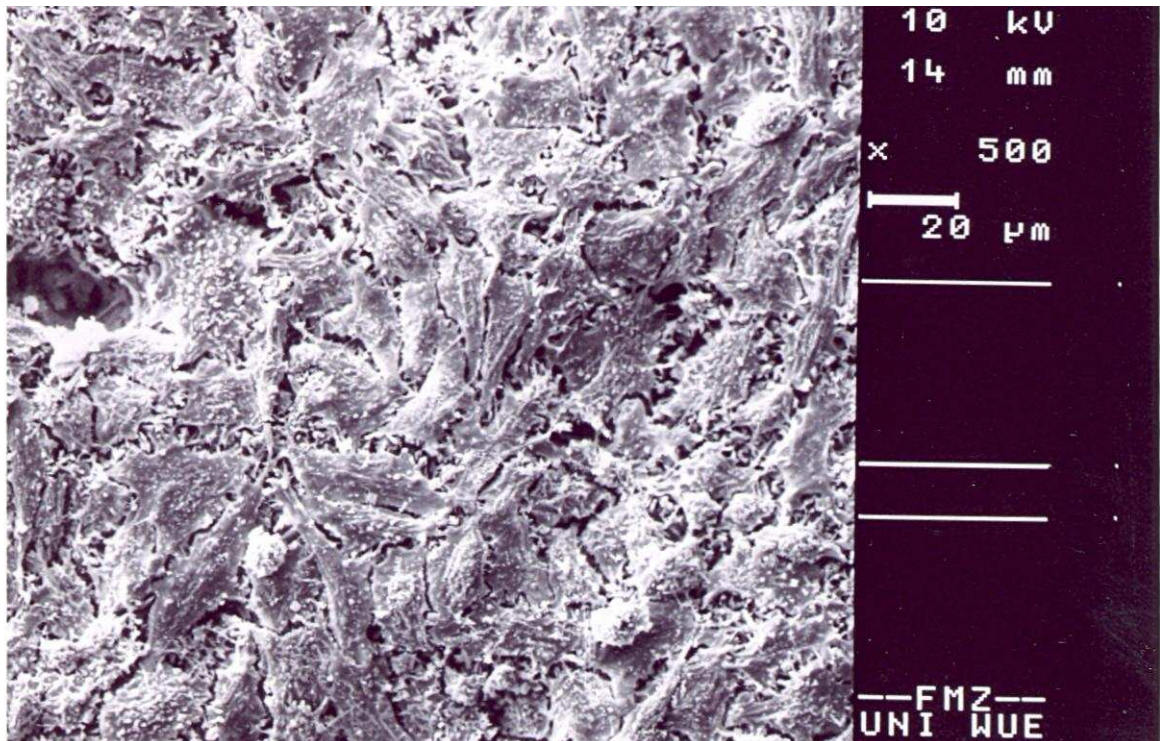


Figura 18. Imagen SEM de los osteoblastos cultivados en la superficie del COFC preparado con β-TCP después de 7 días de cultivo.

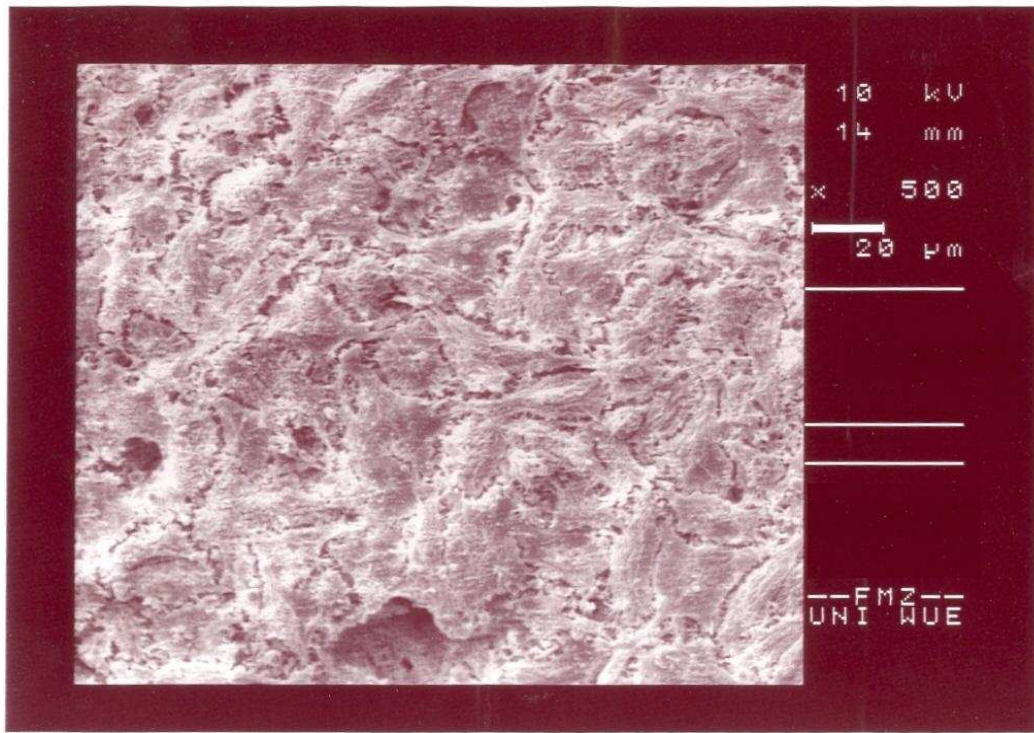


Figura 19. Imagen SEM de los osteoblastos cultivados en la superficie del COFC preparado con 13.3%-Sr-β-TCP después de 7 días de cultivo.

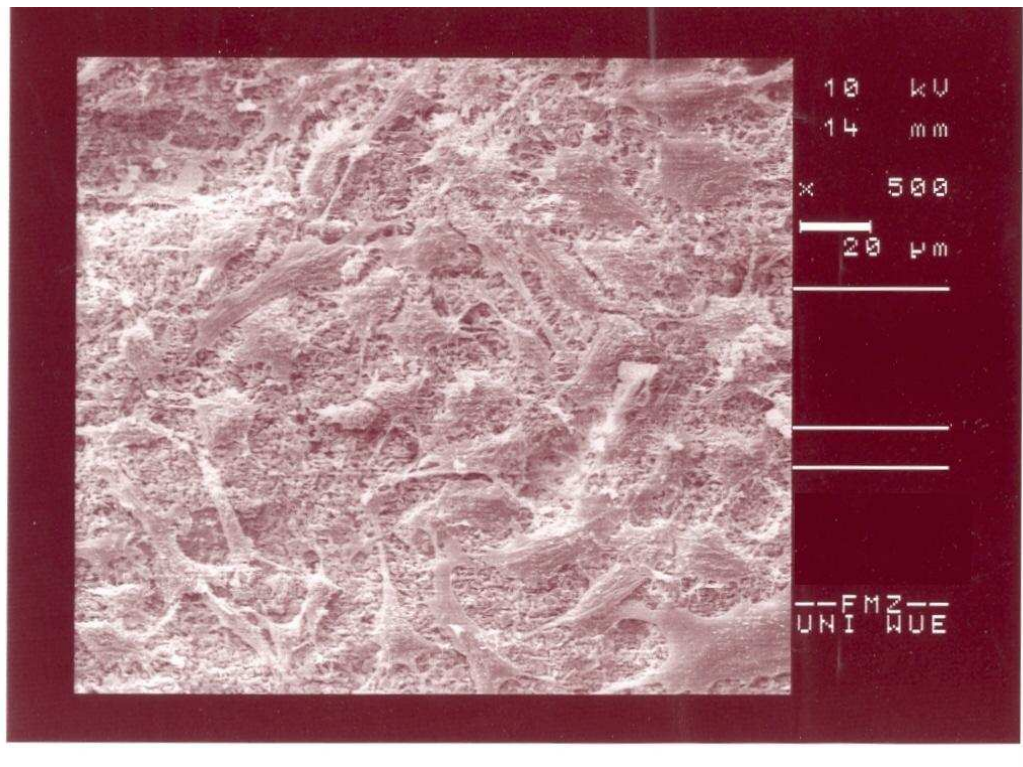


Figura 20. Imagen SEM de los osteoblastos cultivados en la superficie del COFC preparado con 33.3%-Sr-β-TCP después de 7 días de cultivo.

La actividad celular medida por la absorbancia del WST1 en el sobrenadante mostró que la actividad celular aumentó en los días 5 y 7 del cultivo. Esta actividad disminuyó en el día 10 del cultivo debido a la muerte celular por la falta de espacio y nutrientes como una consecuencia del aumento del número de las células (Figura 21). Las diferencias en la actividad celular de los osteoblastos no fueron estadísticamente significativas entre los cementos preparados con β -TCP y los cementos preparados con Sr- β -TCP. El contenido de Sr tampoco afecta significativamente estos resultados.

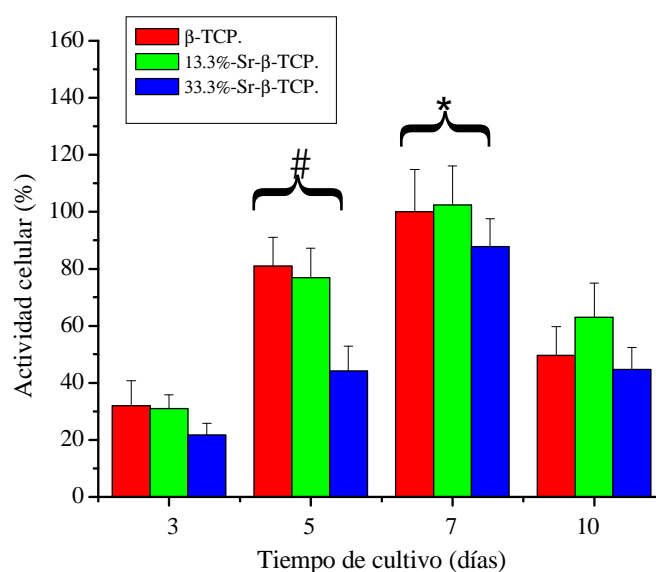


Figura 21. Actividad celular de los osteoblastos de la línea celular humana hFOB1.19.

Aunque la proliferación celular fue aumentando hasta el día 5 del cultivo, las diferencias entre los cementos a distintos tiempos de cultivo no fueron estadísticamente significativas (Figura 22). (#) estadísticamente significativo en comparación con el día 3. (*) estadísticamente significativo en comparación con los días 3 y 10.

Así, la prueba de biocompatibilidad utilizando la línea celular humana hFOB1.19 de osteoblastos mostró que los cementos sustituidos con estroncio son tan adecuados para el crecimiento y la función de osteoblastos como los cementos de brushita preparados con β -TCP, dado que se pudieron observar *in vitro* los procesos de adhesión, extensión y división celular necesarios para el crecimiento de los osteoblastos.

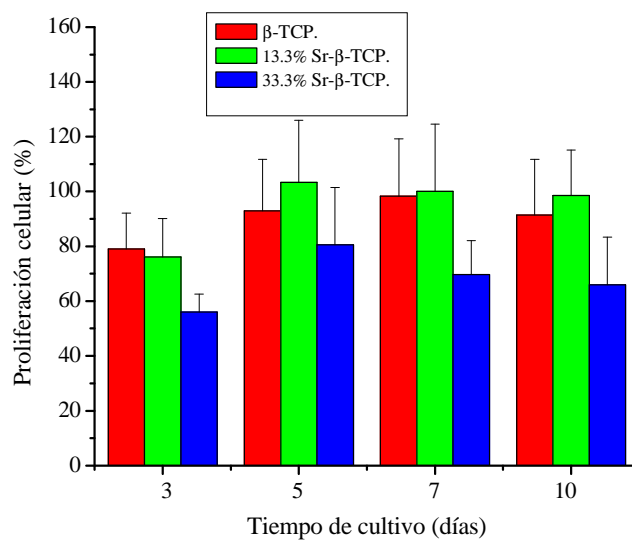


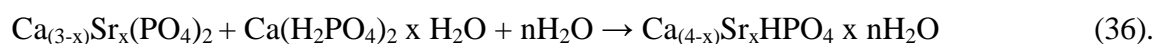
Figura 22. Proliferación celular de los osteoblastos de la línea celular humana hFOB1.19.

8.2.2.2 Discusión

La sustitución iónica es una herramienta eficaz para alterar propiedades como la cristalinidad, la solubilidad y el comportamiento biológico de biomateriales cerámicos [242 y 243]. Así, el ión de calcio fue sustituido por iones de zinc, magnesio y estroncio en cerámicas de hidroxiapatita con el fin de modificar su solubilidad y comportamiento *in vivo* [244-247]. La sustitución iónica por estroncio es interesante dado que los iones de Sr^{2+} estimulan los osteoblastos e inhiben los osteoclastos sumando un efecto positivo en el tratamiento de la osteoporosis [181-184].

La sustitución iónica en un cristal se puede llevar a cabo por calcinación durante la síntesis a alta temperatura de fosfatos cálcicos como la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico o bien por precipitación durante la reacción de fraguado de un biocemento. Esta última fue descrita por Saint-Jean et al., se utilizó el fosfato tricálcico- α sustituido parcialmente por estroncio en la síntesis de un cemento de apatita [240]. La desventaja principal de cerámicas de apatita sustituidos por estroncio es su poca solubilidad *in vivo* permitiendo la liberación de dosis bajas de iones de Sr^{2+} al tejido circundante. Los resultados de Landi et al. confirmaron esta desventaja ya que observó que la liberación de iones de Sr^{2+} disminuyó por debajo de 1 ppm después de 7 días de incubación en solución fisiológica de una hidroxiapatita con contenido de estroncio de 8.7% (peso/peso) [234].

La sustitución iónica de calcio por estroncio en los fosfatos cálcicos secundarios es más eficaz en la liberación de cantidades mayores de estroncio. Esta mayor eficacia se muestra en este estudio para el cemento biodegradable de brushita que fragua según la reacción:



Este nuevo sistema fue eficaz en inducir la sustitución iónica por estroncio en los cristales de fosfatos cálcicos secundarios. Los diagramas de difracción de rayos X del β -TCP y el cemento fraguado muestran un desplazamiento hacia ángulos de difracción bajos (Figuras 1 y 4). Este desplazamiento es debido a que el radio iónico del estroncio es mayor que el del calcio y eso provoca un incremento en la celdilla del cristal

resultante del fraguado con el Sr- β -TCP (Figuras 3y 4). La brushita fue la fase predominante en la matriz de los cementos fraguados a bajas concentraciones de estroncio, mientras que a concentraciones mayores de 20.0% (porcentaje atómico) se formó monetita como la fase predominante en los cementos. Esta formación de monetita podría estar relacionada con los cambios en el pH de los cementos durante la reacción de fraguado. La figura 7 muestra que el contenido más alto de estroncio en Sr- β -TCP mantuvo valores más bajos de pH y las temperaturas máximas durante tiempos más largos. Se conoce de otros estudios previos que este exceso en la acidez de las pastas del cemento junto con la precipitación más lenta del producto de fraguado favorece la formación de monetita [129 y 248].

Se ha mostrado que el ácido cítrico previene la deshidratación de brushita a monetita [126 y 224]. El uso del ácido cítrico en el fraguado del cemento preparado con 33.3%-Sr- β -TCP disminuyó pero no impidió la formación de monetita (Figura 5). Así, la formación de monetita podría ser un resultado o bien de la deshidratación de brushita o de la precipitación directa de monetita.

Los experimentos de liberación en condiciones dinámicas muestran claramente la liberación de los iones de Sr²⁺ al medio incubador y confirman la hipótesis de una liberación más alta de los fosfato cálcicos secundarios que de los biomateriales basados en HA (Figura 12). La liberación inicial de estroncio fue *ca.* 38-58 ppm dependiendo del contenido de estroncio en el cemento. Esta liberación se rebajó a *ca.* 12-30 ppm después de dos días de la incubación. Este nivel de iones de estroncio se mantuvo durante los 14 días del experimento indicando una cinética de liberación de grado cero. Las dosis terapéuticas de estroncio (en forma de renalato de estroncio) administrado por vía oral varían entre 2.4-8.75 mmol/Kg/día. Estudios en animales mostraron que estas dosis aumentaron el nivel de Sr²⁺ en plasma hasta *ca.* 2-18 mg/l [249]. La concentración de iones de estroncio liberados en este estudio esta dentro de este rango.

Además, en el experimento de la liberación se detectó que la composición de la matriz de los cementos se alteraba, transformandose de brushita a HA en el cemento libre de estroncio. Esta transformación a HA se ha descrito anteriormente y se relaciona con la ausencia de renovación (turn over) del líquido, resultando en la saturación del líquido en los poros del cemento con respecto a HA y la reprecipitación de HA [123]. Además, se ha reportado que el mantenimiento de una velocidad alta de la disolución de brushita,

por la renovación del medio incubador, favorece la transformación a HA [136]. Sin embargo, esta transformación de fase no fue observada en la matriz de los cementos modificados con estroncio. Este se debe en primer lugar a que los iones de estroncio inhiben la cristalización de HA y así, suprimen la transformación de brushita. En segundo lugar, las matrices de los cementos a concentración altas de estroncio están compuestas por monetita. Se ha mostrado recientemente que la monetita degrada *in vivo* sin la formación de HA debido a que la solubilidad de monetita no es suficiente para la saturación del líquido entre los poros con respecto a HA.

La prueba de biocompatibilidad mostró que los cementos modificados con estroncio proporcionan un soporte adecuado para el crecimiento y funcionamiento de los osteoblastos (Figuras 21 y 22). Se ha mostrado que el efecto del estroncio en los osteoblastos depende de la dosis de los iones de Sr^{2+} [250]. Una baja dosis de Sr^{2+} (0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$) afectó negativamente la diferenciación celular. Sin embargo, una concentración mayor de 20 y 100 $\mu\text{g/ml}$ inhibió la formación de hidroxiapatita. En un estudio previo [251], se cultivó una hidroxiapatita con contenido de estroncio de 10 mol% con células osteoprecursoras (OPC1). La Sr-HA mejoró la adhesión y la proliferación celular [251]. Además, los iones de Sr^{2+} mejoraron la proliferación de pre-osteoblastos y la síntesis de colágeno [139]. Por lo anteriormente expuesto concluimos que los cementos de estroncio preparados en este estudio son adecuados para la proliferación de osteoblastos.

9. Conclusions

1. We have synthesized and characterized brushite cements prepared with different liquid phases including carboxylic acids, and modified with additives like C4S and hyaluronic acids. Furthermore, we evaluated *in vivo* bone regeneration with brushite granules modified with C4S and glycolic acid.
2. The use of solid weight loss method is efficient in evaluating the cohesion of secondary calcium phosphate cements. The cement with shorter final setting time (FST) has better cohesion than a cement with larger FST. The particles that desintegrated from cement surfaces are formed by beta-tricalcium phosphate (β -TCP).
3. Carboxylic acids inhibit the setting reaction of brushite cement and affect significantly cement cohesion. This effect depends on the solubility of calcium carboxylate in water. The higher the solubility is, more β -TCP particles are liberated to the incubation medium.
4. The viscosity of the liquid phase affects the cohesion of brushite cements. An effect which is more pronounced in the cohesion of cement paste rather than in the set cement. Hyaluronic acid is more efficient than C4S to increase the viscosity of cement liquid phase.
5. The *in vivo* implantation of brushite cement set with glycolic acid modified with C4S achieved similar bone regeneration but with more residual bone graft when compared to brushite cement set with glycolic acid.
6. Ionic substitution of calcium by strontium was performed using 2 methods: i) the addition of water-soluble strontium salt, and ii) the synthesis of strontium substituted β -TCP. The strontium ions incorporation increased the unit cell volume of brushite crystals and inhibits the cement setting reaction. The fraction of β -TCP in the cement matrix was decreased when strontium content was increased.

7. The addition of water-soluble strontium salt limits the cement clinical application as it decreased the cement cohesion and tensile strength. The FST was also inappropriate for clinical application. The addition of both pyrophosphate and strontium ions permits better control of cement setting reaction and improved the cement's mechanical properties.
8. The use of strontium substituted β -TCP resulted in calcium phosphate cement with FST and compressive strength appropriate for clinical application. Moreover, the use of β -TCP with high strontium content facilitates the formation of monetite as the predominant phase in the cement matrix.
9. Monetite forming bio-cement has great potential as bone graft material for its constant degradation and localized leaching of constant strontium ion concentrations at therapeutic ranges for osteoporosis. Monetite did not undergo phase transformation to hydroxyapatite indicating a reliable graft degradation.
10. Strontium-containing calcium phosphate cements provided a good matrix for osteoblasts adhesion, extension and proliferation as proved by *in vitro* culturing of human osteoblast line hFOB1.19.

10. Bibliografía

1. Spiekerman H: Atlas de implantología. Ed. Masson, Barcelona, 1995.
2. Weiss CM. A comparative analysis of fibro-osteal and osteal integration and other variables that affect long term bone maintenance around dental implants. *J Oral Implantol* 1987;13:467-487.
3. Bauer TW, Smith ST: Bioactive materials in orthopaedic surgery. Overview and regulatory considerations. *Clin Orthop* 2002;395:11-22.
4. Strong DM, Friedlaender GE, Tomford WW, et al. Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clin Orthop* 1996;326:107-114.
5. Salamanca ESS. Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales. Tesis Doctoral 2004; Departament de Cirugia i Especialitats Quirúrgiques, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.
6. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21:2405-2412.
7. Roether JA, Gough JE, Boccaccini AR, Hench LL, Maquet V, Jerome R. Novel bioreabsorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactic foams for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:1207-1214.
8. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 1983;174:28-42.
9. Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop* 2002;395:44-52.
10. Toth JM, Lynch KL, Hackbarth DA. Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. *Bioceramics* 1993;6:9-13.
11. Yoon ST, Boden SD. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clin Orthop* 2002;395:33-43.
12. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001;10:S96-S101.
13. Driessens FCM, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Instn Mech Engrs [H]* 1998;212:427-435.
14. Lin FH, Lin CC, Liu HC, Huang YY, Wang CY, Lu CM. Sintered porous DP-bioactive glass and hydroxyapatite as bone substitute. *Biomaterials* 1994;15:1087-1098.
15. Bonefield W. Biomaterials research and development. In *European white book on fundamental research in materials science*. Max-Planck-Gesellschaft, P:72-76.

16. Clinica Reports Orthopaedics: Key markets and emerging technologies, 2002, report no. CBS905E. PJB Publications Limited.
17. Barriga A, Diaz-De-Rada P, Barroso JL, et al. Frozen cancellous bone allografts: positive cultures of implanted grafts in posterior fusions of the spine. *Eur Spine J* 2004;13:152-156.
18. McCann S et al. Outbreaks of infectious diseases in stem cell transplant units: a silent cause of death for patients and transplant programmes. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:519-529.
19. Togawa D, Bauer TW, Lieberman IH, Sakai H. Lumbar intervertebral body fusion cages: histological evaluation of clinically failed cages retrieved from humans. *J Bone Joint Surg Am* 2004;A86:70-79.
20. Cameron DA. The ultrastructure of bone. In the biochemistry and physiology of bone (ed. Bourne GH), 2nd edn, pp. 191-236.
21. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?. *Phil Trans R Soc Lond A* 2004;365:2821-2850.
22. Comín M, Peris JL, Prat JM, Dejoz JR, Vera PM, Hoyos JV. Biomecánica de la fractura ósea y técnicas de reparación. 1999; Instituto de Biomecánica de Valencia, Valencia. Ed. Martín.
23. Goldstein SA. The mechanical properties of trabecular bone dependence on anatomical location and function. *J Biomech* 1987;20:1055-1061.
24. Brustein AH, Reilly DT, Martens M. Aging of bone tissue: mechanical properties. *J bone Joint Surg Br* 1976;58:82-86.
25. Nather A, Ong HJC, Aziz Z. Structure of bone. In Nather A. Bone grafts and bone substitutes: Basic science and clinical application, Baker and Taylor.
26. Posner AS. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* 1969;49:760-792.
27. Butler WT. noncollagenous proteins of bone and dentin: a brief overview. In chemistry and biology of mineralized tissue. ed. Goldberg M, Boskey A, Robinson C, 2000, PP. 137-141. Rosemont, IL:AAOS
28. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;1:59-64.
29. Wuttke M, Muller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem* 2001;276:36839-36848.

30. Gerstenfeld LC, Shih S, George C, Mizumo S, Glowacki J. Effect of overexpression of bone sialoprotein on osteosarcoma tissue growth and mineralization. In chemistry and biology of mineralized tissue, ed. Goldberg M, Boskey A, Robinson C. pp. 143-148. Rosemont, IL: AAOS.
31. Pampena DA, Robertson KA, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK. Inhibition of hydroxiapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochem J* 2004;378:1083-1087.
32. Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 1986;25:1176-1180.
33. Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J, SPAR C. A secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca^{2+} -dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989;109:341-356.
34. Ursit MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
35. Burt DW, Law AS. Evolution of the transforming growth factor –beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* 1994;5:99-118.
36. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomson GH. A SMAD ubiquitin ligase targets BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999;400:687-693.
37. Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenic protein and Bone morphogenic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998;346:26-37.
38. Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, Lizuka T. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:2-5.
39. Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci* 1990;13:149-156.
40. Owen M. Histogenesis of bone cells. *Calc Tissue Res* 1978;25:205-207.
41. Bourne GH. The biochemistry and physiology of bone. 1972 2nd edn, Academic, pp. 1-4.
42. Ross FP. Cytokine regulation of osteoclast formation and function. *J Musculoskel Nueron Interact* 2003;3:282-286.
43. Baron R, Vignery A, Tran Van P. The significance of lacunar erosion without osteoclast: studies on the reversal phase of the remodelling sequence. In metabolic bone disease and related research. Ed Jee WSS, Parfitt, vol 2, pp. 35-41, 1980.

44. Rosen V, Thies RS. The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 1992;8:97-102.
45. Constantino PD, Freidman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am* 1997;27:1037-1073.
46. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996;35:413-417.
47. Triffitt JT. The stem cell of the osteoblast. In: Bilizekian J, Raisz L, Roduo G (eds) *Principles of bone biology*. San Diego, CA: Academic, 1996;39-50.
48. Kurz LT, Garfin SR, Booth JR. Harvesting autogenous iliac bone grafts: A review of complications and techniques. *Spine* 1989;14:1324-1331.
49. Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine* 1992;17:1474-1480.
50. Mankin HJ, Gebhardt MC. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumours. *Clin Orthop* 1996;324:86-97.
51. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL et al. Transmission of human immunodeficiency virus tyoe 1 from a sero-negative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992;326:726-732.
52. Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, et al. Analysis of the size of the specific surface area of bone regeneration materials by gas adsorption. *Mund-Kiefer Gesichts Chir* 2000; 1-5.
53. Benezra Rosen V, Hobbs LW, Spector M. The ultarestructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxiapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials* 2002;23:921-928.
54. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:117-124.
55. McAllister BS, Margolin MD, Cogan AG, et al. Eighteen-Month radiographic and histologic evaluation of sinus grafting with anorganic bovine bone in the chimpanzee. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:361-368.
56. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001;22:1599-1606.
57. Hench LL, Wilson J. Surface active biomaterials. *Science* 1984;226:630-636.
58. Kinnuen I, Aitasalo K, Pollonen M, Varpula M. Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass. *J carniomaxillofac Surg* 2000;28:229-234.

59. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop* 1997;334:316-325.
60. Cao W, Hench LL. Bioactive materials. *Ceramics Int* 1996;22:493-507.
61. Jonck LM, Grobbelaar CJ. Ions bone cement (glass ionomer): An experimental and clinical evaluation in joint replacement. *Clin Mater* 1990;6:323-359.
62. Jonck LM, Grobbelaar CJ. Biological evaluation of glass ionomer cement as an interface in total joint replacement. *Clin Mater* 1989;4:201-224.
63. Jonck LM, Grobbelaar CJ. The biological compatibility of glass ionomer cement in joint replacement. *Clin Mater* 1989;4:85-107.
64. Wittwer C, Devlin AJ, Hatton PV, Brook IM. The release of serum proteins and dye from glass ionomer and acrylic cements: A pilot study. *J Mater Sci* 1994;5:711-714.
65. Peltier LF, Bickel EY. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. *Ann Surg* 1957;146:61.
66. Bell WH. Resorption rate of bone and bone substitutes. *Oral Surg* 1964;17:650-657.
67. Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. *Clin Orthop* 1986;207:290-305.
68. Albee FH, Morrison HF. Studies in bone growth, triple calcium phosphate as stimulus to osteogenesis. *Ann Surg* 1920;71:32.
69. Geesink RGT, De Groot K. Bonding of bone to apatite coated implants. *J Bone Joint Surg Br* 1988;79:17.
70. Byrd HA, Hobar PC. Augmentation of craniofacial skeleton with porous hydroxyapatite granules. *Reconstr Surg* 1993;91:15-22.
71. Holling JO, Brekke J. Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 1996;324:55-65.
72. Havelin LI, Engesaeter LB, Espehaug B, Furnes O, Lie SA, Vollset SE. The Norwegian Arthroplasty Register: 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta Orthop Scand* 2000;71:337-353.
73. Strand Z, Strand J, Povysil C, Urban K. Effect of plasma sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:483-490.
74. Klawitter JJ, Bawell JG. An evaluation of bone ingrowth into porous high density polyethylene. *J Biomed Mater Res.* 1976;10:311.

75. Osborn JF, Newesely H. The materials science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1980;1:108-111.
76. Hulbert SF, Klawitter JJ. Tissue reaction to three ceramics of porous and non porous structures. *J Biomed Mater Res* 1972;6:347.
77. Schoenaers JH, Holmes RE. Healing in interconnected porous hydroxyapatite blocks: Long term histology and histomorphometry. *Trans Soc Biomater* 1985;8:110.
78. Holmes RE, Hagler HK. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstruction: A histometric study. *Plast Reconstr* 1988;81:662-671.
79. Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:169-176.
80. De Groot K, Bioceramics of calcium phosphate. CRC Press, Boca Raton, 1983.
81. Brown W, Chow L. Dental restorative cement pastes. US Patent No. 4518430, 1985.
82. Fernández E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: precipitate formation during setting reactions. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:177-183.
83. Chow LC. Development of self-setting calcium phosphate cements. *J Ceram Soc Jpn Int Ed* 1992;99:927-936.
84. Christoffersen MR, Christoffersen J, Kibalczyk W. Apparent solubilities of two amorphous calcium phosphates and of octacalcium phosphate in the temperature range 30–42°C. *J Cryst Growth* 1990;106:349-354.
85. Lemaître J, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels* 1987;52:141-146.
86. Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury, Int J Care Injured* 2000;31S:D37-D47.
87. Van Wazer JR. Phosphorous and its compounds. Vol. I. Chemistry, Interscience Publisher Inc., New York, 1958.
88. Brown WE, Chow LC in *Cements Research Progress*, edited by P. W. Brown. American Ceramic Society, Westerville, Ohio, 1986, p. 351.
89. Driessens FCM, Verbeeck RMH, *Biomaterials*, CRC Press, Boca Raton, 1990.
90. Vereecke G, Lemaître J. Calculation of the solubility diagrams in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$. *J Cryst Growth* 1990;104:820-832.

91. Fernández E, Boltong MG, Ginebra MP, Bermúdez O, Driessens FCM, Planell JA. Common ion effect on some calcium phosphate cements. *Clin Mater* 1994;16:99-103.
92. Driessens FCM, Verbeeck RMH, in *Implant materials in biofunction* edited by C. de Putter, G.L. de Lange, K. de Groot. Elsevier, Amsterdam, 1988, p. 105.
93. van Kemenade MJJM, de Bruyn PL. A kinetic study of the precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Colloid Interface Sci* 1987;118: 564-85.
94. Driessens FM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA, Ginebra MP, Fernandez E. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:164-170.
95. Brown PW, Fulmer M. Kinetics of hydroxyapatite formation at low temperature. *J Am Ceram Soc* 1991;75:934-940.
96. Hofmann MP, Nazhat SN, Gbureck U, Barralet JE. Real-time monitoring of the setting reaction of brushite-forming cement using isothermal differential scanning calorimetry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;79:360-364.
97. Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials* 2005;26:6423-6429.
98. Axen N, Ahnfelt N-O, Persson T, Hermansson L, Sanchez J, Larsson R. Clotting behavior of orthopaedic cements in human blood. Proceeding of the Ninth annual meeting "Ceramics, cells and tissues", Faenza, Septiembre 28-October 1, 2004.
99. Bernards CM, Chapman J, Mirza S. Lethality of embolized Norian bone cement varies with the time between mixing and embolization. In: Proceeding of the 50th annual meeting of the Orthopaedic Research Society. San Francisco; 2004. Paper No. 0254.
100. Pioletti DP, Takei H, Lin T, Van Landuyt P, Ma QJ, Kown SY, Sung KL. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials* 2000;21:1103-1114.
101. Fernandez E, Boltong MG, Ginebra MP, Driessens FCM, Bermudez O, Planell JA. Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements. *J Mater Sci Lett* 1996;15:1004-1005.
102. Bohner M, Doebelin N, Baroud G. Theoretical and experimental approach to test the cohesion of calcium phosphate pastes. *Eur Cell Mater* 2006;12:26-35

103. Ring TA. Fundamentals of ceramic powder processing and synthesis. 1996, Academic Press, San Diego, USA.
104. Cherng A, Takagi S, Chow LC. Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1997;35: 273-277.
105. Brwon P, Martin R. An analysis of hydroxyapatite surface layer formation. *J Pys Chem B* 1999;103:1671-1675.
106. Constantz B, Ison I, Fulmer M et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995;267:1796-1799.
107. Monma J, Goto M, Kohmura T. Effect of additives on hydration and hardening of tricalcium ohosphate. *Gypsum and Lime* 1984;188:11-16.
108. Ginebra MP, Fernández E, Boltong MG, Bermúdez O, Planell JA, Driessens FCM. Compliance of an apatitic calcium phosphate cement with the short-term clinical requirements in bone surgery, orthopaedics and dentistry. *Clin Mater* 1994;17:99-104.
109. Fulmer MT, Martin RI, Brown PW. Formation of calcium deficient hydroxyapatite at near-physiological temperature. *J Mater Sci Mater Med* 1992;3:299-305.
110. Mirtchi AA, Lemaître J, Munting E. Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate - dicalcium phosphate - calcite cements. *Biomaterials* 1990;11:83-88.
111. Driessens F. Chemistry and applied aspects of calcium phosphate bone cements. Concepts and clinical applications of ionic cements. Sept. 8, Arcachon, France, 1999.
112. Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H et al. In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1995;16:855-860.
113. Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M et al. Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 1999;48:36-42.
114. Young S, Holde M, Gunasekaran S, Poser R, Constanz B. The correlation of radiographic, MRI and histological evaluations over two years of a carbonated apatite cement in a rabbit model. Proceedings of the 44th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, New Orleans, USA, March 16-19, 1998:846.
115. Eppley B. Development and clinical results of synthetic calcium phosphate materials in craniomaxillofacial surgery. Concepts and clinical applications of ionic cements. Sept. 8, 1999, Arcachon, France.

116. Elliott J. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994.
117. Brown W, Smith J, Lehr J, Frazier A. Octacalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 1962;196:1050-1055.
118. Monma H, Kamiya T. Preparation of hydroxyapatite by the hydrolysis of brushite. *J Mater Sci* 1987;22:4247-4250.
119. Monma H, Makishima A, Mitomo M, Ikegami T. Hydraulic properties of the tricalcium phosphate-dicalcium phosphate mixture, Nippon-Seramikkusu-Kyokai-Gakujutsu-Ronbushu 1988;96:878-880.
120. Driessens FCM, de Maeyer EAP, Fernández E, Boltong MG, Berger G, Verbeeck RMH, Ginebra MP, Planell JA. Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. En: *Bioceramics Vol. 9 (Proceedings of the 9th International Symposium on Ceramics in Medicine)*, Kokubo T, Nakamura T, Miyaji F, eds., Pergamon, Otsu, 1996, pp. 231-234.
121. Mirtchi AA, Lemaitre J, Terao N. Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate - monocalcium phosphate system. *Biomaterials* 1989;10:475-480.
122. Bohner M, Lemaitre J, Ring T. Hydraulic properties of tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. In: Duran P, Fernandez JF. eds *Third euro-ceramics*. Castellon de la Plana, Spain: Faenza Editrice Iberica S.L.,1993.
123. Constantz B, Barr B, Ison I et al. Histological, chemical and crystallographic analysis of four calcium phosphates in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 1998;43:451-461.
124. Bohner M, Van Landuyt P, Merckle H, Lemaitre J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:675-781.
125. Bohner M. Propriétés physico-chimiques et ostéogéniques d'un biociment hydraulique à base de phosphates de calcium. PhD Thesis No. 1171, Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne (EPFL), Lausanne, 1993.
126. Bohner M, Merkle HP, Landuyt PV, Trophard G, Lemaitre J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:111-116.
127. Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:1-11.
128. Ryall RL, Harnett RM, Marshall VR. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* 1981;112:349-356.

129. Grover LM, Gbureck U, Young AM, Wright AJ, Barralet JE. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-Pyrophosphoric acid bone cement. *J Mater Chem* 2005;15:4955-4962.
130. Bohner M, Lemaitre J, Ring TA. Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of β -tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. *J Am Ceram Soc* 1996;79:1427-1434.
131. Ryshkewitch E. Compression Strength of Porous Sintered Alumina and Zirconia 9th communication to ceramography. *J Am Ceram Soc* 1953;36(2):65-68.
132. Lemaitre J. Injectable calcium phosphate hydraulic cements: new developments and potential applications. *Innovations in Tech Biol Med* 1995;16:109-120.
133. Andrianjatovo H, José F, Lemaitre J. Effect of β -TCP granulometry on setting time and strength of calcium phosphate hydraulic cements. *J Mater Sci Mater Med* 1996;7:34-39.
134. Ishikawa K, Takagi S, Chow L, Ishikawa Y, Eanes E, Asaoka K. Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dent Mater* 1994;10:26-32.
135. Ikenaga M, Hardouin P, Lemaitre J, Andrianjatovo H, Flautre B. Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1998;40:139-144.
136. Grover LM, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2003;24:4133-4141.
137. Bohner M, Matter S. Brushite hydraulic cement stabilized with a magnesium salt. US Patent number 6733582, 2004.
138. Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 1999;25:35S-39S.
139. Grover LM, Gbureck U, Wright AJ, Tremayne M, Barralet JK. Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro. *Biomaterials* 2006;27:2178-2185.
140. Amjad Z, Koutsoukos PG, Nancollas GH. The crystallization of hydroxyapatite and fluorapatite in the presence of magnesium ions. *J Colloid Inter Sci* 1984;101:250-256.
141. Driessens, F. C. M. Physiology of hard tissues in comparison with the solubility of synthetic calcium phosphates. *Ann NY Acad Sci* 1988;523:131-136.

142. Böhner M, Lemaître L, Ohura K, Hlémaitre P, Ohura K, Hardouin P. Effects of sulfate ions on the in vitro properties of β -TCP - MCPM - water mixtures. Preliminary in vivo results. *Ceramics Transactions* 1995;48:245-259.
143. Ohura K, Böhner M, Hardouin P, Lemaître J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996;30:193-200.
144. Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaître J, Leroy G. Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model. *Bone* 1999;25:81S-84S.
145. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Böhner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005;26:4383-4394.
146. Xia Z, Grover LM, Huang Y, Adamopoulos IE, Gbureck U, Triffitt JT, Shelton RM, Barralet JE. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. *Biomaterials* 2006;27:4557-4565.
147. Okura K, Böhner M, Hardouin P, Lemaître J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996;30:193-200.
148. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clement C, Lopez-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006;33:922-928.
149. Constantz BR, Barr BM, Quiaoit J, Ison IC, Baker JT, Mackinney L, Goodman SB, Sumner DR, Gunasekaran S. Conversion of brushite bone cement to hydroxyapatite in rabbit model defects. In 4th World Biomaterials Congress, Berlin, Germany, 1992, P. 56.
150. Driessens FCM, Boltong MG, Zapatero, MI, Verbeeck RMH, Bonfield W, Bermudez O, Fernandez E, Ginebra MP, Planell JA. In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:272-278.
151. Jansen J A, Wolke JGC, Hayakawa T, Planell J, Driessens FCM. A histological and mechanical evaluation of the effect of Ca-P cement on bone apposition. In 5th World Biomaterials Congress, Toronto, Canada, 1996, p. 65.
152. Jansen JA, de Ruyter JE, Schaeken HG, van der Waerden JPCM, Planell JA, Driessens FCM. Evaluation of tricalcium phosphate/hydroxyapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:653-657.
153. De Bruijn JD, Bovell YP, Planell JA, Driessens FCM. Osteoclast responses to two types of experimental calcium phosphate bone cements. In 5th World Biomaterials Congress, Toronto, Canada, 1996, p. 121.

154. Oreffo ROC, Driessens FCM, Planell JA, Triffitt JT. Effects of novel calcium phosphate cements on the in vitro growth and differentiation of osteoprogenitors from human marrow. In 13th European Conference on Biomaterials, Goteborg, Sweden, 1997, p. 86.
155. Driessens FCM, van Loon JA, van Sliedregt A, Planell JA. Cytotoxicity testing of five calcium and one magnesium phosphate cement in vitro. In 11th European Conference on Biomaterials, Pisa, Italy, 1994, pp. 344-346.
156. Goldstein SA, Frankenbug EP, Harris S, Toomajian L, Bakker DA. Evaluation of a bioresorbable in situ setting calcium phosphate cement in an in vivo defect model. In 10th European Conference on Biomaterials, Davos, Switzerland, 1993, p. 47.
157. Schwarz PD, Turners S, Bauer TW, Constantz BR. Evaluation of an in-situ setting carbonated calcium phosphate cement in a dynamically loaded canine femoral component. In 10th European Conference on Biomaterials, Davos, Switzerland, 1993, p. 144.
158. Hayes DEE, Matthews JG, Poser RD, Constantz BR. Augmentation of cementless femoral stems to improve initial stability using a remodelable calcium phosphate bone mineral substitute. In 61st Annual Conference of American Academy of Orthopaedic Surgeons, New Orleans, Louisiana, 1994.
159. Poser RD, Hayes DEE, Ladd AL, Quiaoit JG, Nachiondo JM, Constantz BR. Augmentation of Colles' fracture fixation using an injectable, in situ hardening remodelable calcium phosphate bone mineral substitute. In 61st Annual Conference of American Academy of Orthopaedic Surgeons, New Orleans, Louisiana, 1994.
160. Friedman CD, Costantino PD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA. Hydroxyapatite cement. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:385-389.
161. Sugawara A, Nishiyama M, Kusama K, Moro I, Nishimura S, Kudo I, Chow LC, Takagi S. Histopathological reactions of calcium phosphate cement. Dent Mater J 1992;11:11-16.
162. Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA. Hydroxyapatite cement. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:379-384.
163. Yoshimine Y, Sumi M, Isobe R, Anan H, Maeda K. In vitro interaction between tetracalcium phosphate-based cement and calvarial osteogenic cells. Biomaterials 1996;17:2241-2245.
164. Kurashina K, Kurita H, Hirano M, de Bleeck JMA, Klein CPAT, de Groot K. Calcium phosphate cement: in vitro and in vivo studies of the α -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate dibasic-tetracalcium phosphate monoxide system. J Mater Sci Mater Med 1995;6:340-347.

165. Kurashima K, Kurita H, Kotani A, Takeuchi H, Hirano M. In vivo study of a calcium phosphate cement consisting of α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide. *Biomaterials* 1997;18:147-151.
166. Unezaki Y, Rynmon H, Inoue H, Okuda H, Oonishi H, Minamigana K, Sugihara F. Histocompatibility of a bone graft cement, consisting of tetracalcium phosphate, dicalcium phosphate dihydrate and citric acid. *Bioceramics* 1996, 9, 251–253.
167. Yoshikawa M, Toda T, Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Hayani S, Mandai Y, Sugihara F. Osteocompatibility and biocompatibility of tetracalcium phosphate cement containing cellulose. *Bioceramics* 1994;6:187-192.
168. Otsuka M, Matsuda Y, Yu D, Wong J, Fox JL, Higuchi WI. A novel skeletal drug delivery system for anti-bacterial drugs using self-setting hydroxyapatite cement. *Chem. Pharm Bull* 1990;38:3500-3502.
169. Nachiondo JM, Poser RD, Goodman SB, Constantz BR. Antibioitic impregnation of a resorbable calcium phosphate cement. En: *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, Boston, 1994.* p. 146.
170. Takano I, Ishii Y, Shimoda M, Takashima Y, Sasaki S. Experimental study of apatite cement including antibiotics. En: *Bioceramics Vol. 9 (Proceedings of the 9th International Symposium on Ceramics in Medicine)*, Kokubo T, Nakamura T, Miyaji F, eds., Pergamon, Otsu, 1996, pp. 267-270.
171. Hammanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T. A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 1996;33:139-143.
172. Kamegai A, Shimamura N, Naitou K, Nagahara K, Kanematsu N, Masahiko M. Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as a delivery system. *Biomed Mater Eng* 1994;4:291-307.
173. Ohura K, Hamanishi C, Tanaka S, Matsuda N. The healing of segmental bone defects induced by bioresorbable calcium phosphate cement combined with rhBMP-2. En: *Bioceramics Vol. 9 (Proceedings of the 9th International Symposium on Ceramics in Medicine)*, Kokubo T, Nakamura T, Miyaji F, eds., Pergamon, Otsu, 1996, pp. 247-250.
174. Bohner M, Lemaître J, Van Landuyt P, Zambelli P-Y, Merkle HP, Gander B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 1997;86:565-572.
175. Tamimi F, Torres J, Bettini R, Ruggera F, Rueda C, López-Ponce M, Lopez-Cabarcos E. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:707-714.

176. Gbureck U, Vorndran E, Müller FA, Barralet JE. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J Control Release* 2007;122:173-180.
177. Consensus Development Conference. Diagnosis, Prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;94:646-650.
178. Rico Lenza H, Pérez Infante V. Edad sexo y hueso II. *Rev Esp Gerontol* 1979;14:409-416.
179. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet*. 2002 May 18;359(9319):1761-1767.
180. Poole KE, Compston JE. Osteoporosis and its management. *BMJ*. 2006 Dec 16;333(7581):1251-1256.
181. Baron R, Tsouderos Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 2002;450:11-17.
182. Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T. S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 2003;18:1082-1087.
183. Marie PJ. Strontium ranelate: A physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* 2006;38:S10-S14.
184. Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salts S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 1996;18:517-523.
185. Johal KK, Hill RG, Brook IM. In vivo response of strontium and zinc based ionomeric cement implants in bone. *J Mater Sci Materials in medicine*. 2002;13:375-379.
186. Nishimura I, Hosokawa R, Atwood DA. The knife-edge tendency in mandibular ridges in women. *J Prosthet Dent* 1992;67:820-826.
187. Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8:137-144.
188. Rokita E, Hermes C, Nolting HF, Ryzek J. Substitution of calcium by strontium within selected calcium phosphates. *J Crys Growth* 1993;130:543-552.
189. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N, Barenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* 1997;20:47-45.
190. Okayama S, Akao M, Nakamura S, Shin Y, Higashikata M, Aoki H. The mechanical properties and solubility of strontium-substituted hydroxyapatite. *Bio-med Mater* 1991;1:11-17.

191. Ni GX, Lu WW, Xu B, Chiu KY, Yang C, Li ZY, Lam WM, Luk KD. Interfacial behaviour of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. *Biomaterials* 2006;27:5127-5133.
192. Leroux L, Lacout JL. Preparation of calcium strontium hydroxyapatites by a new route involving calcium phosphate cements. *J Mater Res* 2001;16:171-176.
193. Guo D, Xu K, Zhao X, Han Y. Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement. *Biomaterials* 2005;26:4073-4083.
194. Welch J, Gutt W. High-temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide. *J Chem Sot* 1961;4442-4444.
195. Faleh TM, Blanco L, Lopez-Cabarcos E. The effect of carboxyl groups on the setting of brushite cement. In: *Proceedings of the society for biomaterials*. Philadelphia; 2004. Paper No. 28.
196. Hofmann MP, Lilley KJ, Gbureck U, Barralet JE. Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants. In: *Proceedings of the 19th european conference on biomaterials*. Naples; 2005. Paper No. P418 411.
197. Xin Y, Ye F, Cai S, Yao K, Cui J, Song X. Gelatin manipulation of latent macropores formation in brushite cement. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:255-261.
198. ASTM-Standard C266-99: Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gilmore needles, ASTM International 2002.
199. Lowell S, Shields JE. Powder surface area and porosity. Chapman and Hall, New York, 1984.
200. Andrianjatovo H, Lemaitre J. Effects of polysaccharides on the cement properties in the monocalcium phosphate/b-tricalcium phosphate system. *Innov Tech Biol Med* 1995;16:141-147.
201. Khairoun I, Driessens FCM, Boltong MG, Planell JA, Wenz R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1999;20: 393-398.
202. Ishikawa K, Miyamoto Y, Takechi M et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: hydroxyapatite slurry containing an increased amount of sodium alginate. *J Biomed Mater Res* 1997;36:393-399.
203. Curry NA, Jones DW. Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate: a neutron-diffraction investigation. *J Chem Soc A* 1971:3725-3729.
204. Dickens B, Schroeder LW, Brown WE. Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in $\text{B-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *J Solid State Chem* 1974;10:232-248.

205. MacLennan G, Beevers CA. The crystal structure of dicalcium phosphate, CaHPO_4 . *Acta Cryst C* 1955;8:579-583.
206. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11:318-326.
207. Smith IO, Baumann MJ, McCabe LR. Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:436-441.
208. Suzuki T, Nishizawa K, Yokogawa Y, Nagata F, Kawamoto Y, Kameyama T. Time-dependent variation of the surface structure of bioceramics in tissue culture medium and the effect on adhesiveness of cells. *J Ferment Bioeng.* 1996;81:226-232.
209. Peña J, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique. *J Eur Ceram Soc* 2003;23:1687-1696.
210. Linton JL, Sohn BW, Yook JI, Le Geros RZ. Effects of calcium phosphate ceramic bone graft materials on permanent teeth eruption in beagles. *Cleft Palate Craniofac J* 2002;39:197-207.
211. Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T. Mechanism of apatite formation on $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ glasses in a simulated body fluid. *J Non-Cryst Solids* 1992;143:84-92.
212. Ohtsuki C, Miyazaki T, Tanihara M. Development of bioactive organic-inorganic hybrid for bone substitutes. *Mater Sci Eng: C* 2002;22:27-34.
213. Mojumdar SC, Raki L. Preparation, thermal, spectral and microscopic studies of calcium silicate hydrate-poly (acrylic acid) nanocomposite materials. *J Therm Anal Cal* 2006;85:99-105.
214. Shneiders W, Reinstorf A, Ruhnnow M, et al. Effect of chondroitin sulphate on material properties and bone remodelling around hydroxyapatite/collagen composites. *J Biomed Mater Res* 2008;85A:638-645.
215. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, et al. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 2006;27:5561-5571.
216. Flade K, Lau C, Mertig M, Pompe W. Osteocalcin-controlled dissolution-reprecipitation of calcium phosphate under biomimetic conditions. *Chem Mater* 2001;13:3596-3602.
217. Hofmann MP, Young AM, Gbureck U, Nazhat SN, Barralet JE. FTIR-monitoring of a fast setting brushite bone cement: effect of intermediate phases. *J Mater Chem* 2006;16:3199-3206.
218. Barralet JE, Tremayne M, Lilley KJ, Gbureck U. Modification of calcium phosphate cement with α -hydroxy acids and their salts. *Chem Mater* 2005;17:1313-1319.

219. Fleisch H, Maerki J, Russell RG. Effect of pyrophosphates on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;122:317-320.
220. Jacques Chappuis. A new model for a better understanding of the cohesion of hardened hydraulic materials. *Colloids Surf A Physicochemical and Engineering Aspects* 1999;165:223-241.
221. Khayat KH. Viscosity-enhancing admixtures for cement-based materials. *Cem Concr Compos* 1998;20:171-188.
222. Gbureck U, Dembski S, Thull R, Barralet JE. Factors influencing calcium phosphate cement shelf-life. *Biomaterials* 2005;26:3691–3697.
223. Bierbaum S, Douglas T, Hanke T, et al. Collagenous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: Characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A* 2006;84:805-816.
224. Erskine L, McCaig CD. Integrated interactions between chondroitin sulphate proteoglycans and weak dc electric fields regulate nerve growth control guidance *in vitro*. *J Cell Sci* 1997;302:527-534.
225. Ohgaki M, Kizuki T, Katsura M et al. Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res* 2001;57:366-373.
226. Wollenweber M, Domashke H, Hanke T, et al. Mimicked bioartificial matrix containing chondroitin sulphate on a textile scaffold of poly(3-hydroxybutyrate) alters the differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006;12:345-359.
227. Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 1989;264:13369-13372.
228. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867-869.
229. Rees SG, Hughes DT, Wassell HDT, Shellis RP, Embury G. Effect of serum albumin on glycosaminoglycan inhibition of hydroxyapatite formation. *Biomaterials* 2004;25:971-977.
230. Chander S, Fuerstenau DW. Stability and interfacial properties of hydroxyapatite-a review. In: Misra DN, editor. *Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite*. New York: Plenum Press;1984. p. 29-49.
231. Blumenthal NC, Betts F, Posner AS. Effect of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite. *Calcif Tissue Res* 1975;25:81-90.

232. Bigi A, Foresti M, Gandolfi M, Gazzano M, Roveri N. Isomorphous substitutions in β -tricalcium phosphate: the different effects of zinc and strontium. *J Inorg Biochem* 1997; 66:259-265.
233. Saint-Jean SJ, Camire CL, Nevsten P, Hansen S, Ginebra MP. Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted alpha-TCP cements. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16: 993-1001.
234. Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S, Sandri M, Logroscino G. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomater* 2007;3:961-969.
235. Anderson HC, Hsu HH, Morris DC, Fedde KN, Whyte MP. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol* 1997;151:1555-1561.
236. Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* 1978;13:361-371.
237. Fleisch H, Schibler D, Maerki J, Frossard I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature* 1965;207:1300-1301.
238. Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 1984;231:1-8.
239. Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T, Takeuchi H. Four calcium ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials* 1993;14:216-224.
240. Böhner M, Lemaître J, Ring TA, in *Third Euro Ceramics*, ed. Duran J and Fernandez JA. Fernandez Faenza Editrice Iberica, Castellon de la palna, 1995, pp. 95-100.
241. Kannan S, Pina S, Ferreira JMF. Formation of strontium-stabilized β -tricalcium phosphate from calcium-deficient apatite. *J Am Ceram Soc* 2006;89:3277-3280.
242. Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N, Shah JS. The role of magnesium on the structure of biological apatites. *Calcif Tissue Int.* 1992;50:439-444.
243. Arsenaults AL, Grynpas MD. Crystals in calcified epiphyseal cartilage and cortical bone of the rat. *Calcif Tissue Inter* 1988;43:219-225.
244. Mayer I, Apfelbaum F, Featherstone JD. Zinc ions in synthetic carbonated hydroxyapatites. *Arch Oral Biol* 1994;39:87-90.
245. LeGeros RZ, Trautz OR, LeGeros JP, Klein E. Carbonate substitution in the apatite structure. *Bull Soc Chim Fr* 1968; Spec. No.:1712-1718.

246. Heijligers HJ, Driessens FC, Verbeeck RM. Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and strontium hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* 1979;29:127-131.
247. Bigi A, Marchetti F, Ripamonti A, Roveri N. Magnesium and strontium interaction with carbonate-containing hydroxyapatite in aqueous medium. *J Inorg Biochem* 1981;15:317-327.
248. Böhner M, Merkle HP, Lemaître J. In vitro aging of a calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:155-162.
249. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone, *Bone* 2001; 28: 446-453.
250. Verberckmoes SC, De Broe ME, D'Haese PC. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney Int* 2003;64:534-543.
251. Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, Cheung KM, Luk KD. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:804-814.

11. Abreviatura

APC	Fosfato clácico amorfo
α -TCP	Fosfato tricálcico- α
BCP	Fosfato cálcico bifascio
BMP	Proteína morfogénica óseo
β -TCP	Fosfato cálcico- β
CC	Carbonato cálcico
CDHA	Hidroxiapatita deficiente en calcico
COFC	Cemento óseo de fosfato cálcico
C4S	Chondroitin 4 sulfato
CS	Fuerza de compresión
DCPA	Fosfato dicálcico anhidro, moentita
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado, brushita
DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencia de barrido
DTS	Fuerza de tensión diametral
ECM	Matriz extracelular
FST	Tiempo de fraguado final
FTIR	Transformada de Fourier de espectros infrarojos
HA	Hidroxiapatita
ICSD	Base de datos de la estructura de los cristales inorgánicos
MCPM	Fosfato monocálcico monohidratado
MCPA	Fosfato monocálcico anhidro
OC	Osteocalcina
OCP	Fosfato octacálcico

11. Abreviatura

ON	Osteonectina
PHA	Hidroxiapatita precipitada
SP	Sialoproteína ósea
Sr	Estroncio
Sr- β -TCP	Fosfato tricálcico- β sustituido por estroncio
TTCP	Fosfato tetracálcico

12. Trabajos derivados de la tesis

12.1 Journal of Biomedical Materials Research-Part A



Beta-tricalcium phosphate release from brushite cement surface

M. Hamdan Alkhrasat,^{1,2} F. Tamimi Marifio,^{1,2} J. Rubio Retama,³ L. Blanco Jerez,¹ E. López-Cabarcos²

¹Departamento de Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040 Madrid, Spain

²Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040 Madrid, Spain

³Leibniz Institute für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Strasse 6, 01069 Dresden, Germany

Received 3 October 2006; revised 26 February 2007; accepted 9 March 2007

Published online 16 July 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.a.31381

Abstract: Different *in vivo* studies demonstrated that brushite cements are biocompatible, bioresorbable, and osteoconductive. However, the decay of brushite cements has been scarcely studied even though it may be of great concern for clinical applications in highly blood-perfused regions. This work was elaborated to elucidate factors that determine brushite cement surface disintegration. For that, brushite cements were modified using in their preparation different aqueous solutions of phosphoric, glycolic, tartaric, and citric acids in concentrations that were reported to improve the cement properties. Two-viscosity enhancing polysaccharides, chondroitin-4 sulfate and hyaluronic acid, were also assayed. Thereafter, pre- and set cement samples were immersed in distilled water for 24 h. The cement-solid weight loss, microstructure, liquid phase viscosity, mean size of the released particles, and zeta potential were analyzed using X-ray diffraction, FTIR spectroscopy, light scattering, scanning electron micro-

copy and optical microscopy. It was found that the particles released from the cement surface were β -TCP, and their amount depends on the carboxylic acid used in the preparation of the cement. The addition of hyaluronic acid and chondroitin-4 sulfate decreased the amount of released particles from the surface of the set brushite cement made with citric acid. Furthermore, the hyaluronic acid increased significantly the viscosity of the citric acid solution and the cement paste prepared with this liquid phase showed a pronounced step down in particle release. In this study, we showed that the water solubility of calcium carboxylate and the viscosity of mixing liquid may dictate the superficial disintegration of brushite cements. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res* 84A: 710–717, 2008

Key words: brushite; cement; disintegration; cohesion; β -TCP

INTRODUCTION

Bone regeneration grafts are used for the treatment of osseous defects caused by infection, trauma or tumors. Autologous bone is the ideal bone graft as it possesses all the characteristics required for new bone growth, namely osteoconductivity, osteogenicity, and osteoinductivity. Autografting, however, presents several problems like morbidity at the donor site, chronic pain and the bone graft quantity which can be harvested is limited.

Correspondence to: E. Lopez-Cabarcos; e-mail: cabarcos@farm.ucm.es

Contract grant sponsor: DGI, Spanish Science and Education Ministry; contract grant number: MAT2006-13646-C03-01

Contract grant sponsor: CAM-UCM Program for "Consolidation of Research Groups"; contract grant number: CCG06-UCM/SEM-1093

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Biocompatible and osteoconductive calcium phosphate cements (CPCs) provide a potential alternative to autografted bone. CPCs are made of a liquid phase and a powder phase mixed together to form a workable paste that can be easily adapted to fill bone defects. Several CPCs with potential clinical use in orthopedic and maxillofacial fields have been developed.¹ According to the end-product of the setting reaction, hydraulic CPCs can be classified into apatite cements (HA) and brushite, dicalcium phosphate dihydrate, cements (DCPD).

The number of studies dedicated to apatite cements is much higher than those devoted to brushite cements. The reason is that apatite, the calcium phosphate phase present in bone, has better mechanical properties and sets at neutral pH.² However, an increasing interest in brushite cements is originated from the fact that brushite is metastable in physiological conditions³ and can be resorbed *in vivo* at a rate faster than hydroxyapatite.^{4,5} Brushite cement setting reaction proceeds very fast and retardants such as α -hydroxy acids (citric,^{6–8} glycolic,⁹ and tartaric¹⁰) have

to be incorporated in the cement to obtain workable setting times. For clinical use, two properties of the cement are of paramount importance: cohesion and biodegradation. The improvement of these properties is of great importance for clinical applications in highly blood-perfused regions.

Within the cement cohesion studies, different definitions such as nondecay,¹¹ compliance,^{12,13} stability,¹⁴ or cohesion, defined as the ability of cement to stay in one piece during setting,¹ were used. The extreme importance of this topic is illustrated by recent findings showing that CPC particles with size smaller than 10 μm could be harmful for the osteoblast cells since a decrease in the viability, proliferation, and production of extracellular matrix was measured.¹⁵ The clinical experience with calcium cement as bone void filler for (balloon-) vertebroplasty is limited, and large series are rare.¹⁶ However, it was found that small volumes of intravascular CPCs resulted in right ventricle occlusion and massive pulmonary embolism.¹⁷ The authors hypothesized that the cement microparticles might act as a scaffold for platelet aggregation while free calcium, which is an important cofactor for blood clotting, could further enhance the coagulation cascade. Cement particle release upon contact with aqueous medium may compel the clinician to keep a dry operation field during the whole period over which CPC disintegrates,¹² thus, restricting the use of CPC in highly blood-perfused regions.

Several processes are involved in brushite cement biodegradation including dissolution, fragmentation, phase transformation to HA,^{18–20} and *in vivo* macrophage phagocytosis of cement particles.²¹ In a recent *in vitro* biodegradation study of brushite cements by a macrophage cell-line, no phagocytosed cement particles were detected. However, cell processes were observed to penetrate deeply into the surface of the cement engulfing cement particles.²²

Solution-driven brushite degradation was studied in phosphate-buffered salt solution (PBS) and serum.²³ It was reported that the use of higher volumes of the ageing medium, together with frequent medium refreshment increased the cement weight loss. Furthermore, it was reported that the maintenance of a higher rate of brushite dissolution favors HA formation.²³ The conversion to HA reduced brushite cement resorption.²⁴ To prevent this process either pyrophosphoric acid²⁵ or poorly-soluble magnesium salts were used.²⁴ Magnesium adsorbs on the surface of newly forming HA crystal nuclei and active growth sites,²⁶ inhibiting further HA crystal formation.

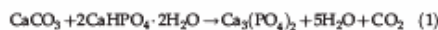
The aim of the present study was to identify factors that dictate the release of surface brushite cement particles to the ageing medium. Herein, brushite cements were modified with different aqueous solutions of phosphoric, glycolic (1 carboxylic group),

tartaric (2 carboxylic groups), and citric (3 carboxylic groups) acids using the optimum acid concentrations for cement mechanical properties.^{9,10} In addition, two-viscosity enhancing polysaccharides, chondroitin-4 sulfate, and hyaluronic acid were also assayed to investigate the influence of the liquid phase viscosity on brushite cement disintegration.

MATERIALS AND METHODS

Brushite cement synthesis

DCPD, monocalcium phosphate (MCP), calcium carbonate (CC), sodium pyrophosphate, glycolic acid, hyaluronic acid, chondroitin-4 sulfate (C4S) (all from Sigma-Aldrich), L-(+)-tartaric and citric acid (Panreac) were used without further purification. Beta-tricalcium phosphate (β -TCP) was synthesized by heating a stoichiometric mixture of CC and DCPD at 900°C for 14 h [Eq. (1)]. Formation of pure β -TCP was assured by X-ray diffraction analysis:



The cement solid phase was prepared by mixing β -TCP (1.428 g), MCP (0.8 g), and sodium pyrophosphate (0.012 g) using a pestle and mortar. The β -TCP/MCP molar ratio 1.35 was selected to obtain an excess of β -TCP that improves cement compatibility²⁴ and slows down the resorption rate of the cement *in vivo*.²⁰

Different cement liquid phases were prepared from aqueous solutions as follows: 2M phosphoric acid, 1M glycolic acid, 0.5M citric acid, 0.5M tartaric acid, 0.5M citric acid mixed with 0.5% (w/w) C4S, and 0.5M citric acid mixed with 0.5% (w/w) hyaluronic acid. The viscosity of carboxylic acid solutions was measured on a Couette-type viscometer at 25°C and plotted against their corresponding shear rates to extrapolate the viscosity values at zero shear rate.

The cement setting reaction was induced by mixing the solid phase with the liquid phase using a spatula over a glass slab for 30 s, with a powder to liquid ratio (P/L) of 2.5. The cement setting reaction occurs as follows [Eq. (2)]:



Preparation of cylindrical brushite cement samples

The cement paste resulting from mixing the liquid and solid phases was used to fill one-face-opened polyethylene cylinders with an internal diameter of 10 mm and a height of 5 mm. The cement sample volume ($\sim 39.25 \text{ mm}^3$) and the exposed cement surface ($\sim 78.5 \text{ mm}^2$) were kept constant for all specimens.

Measurement of cement final setting time

The cement setting time was measured according to the international standard ISO1566 for dental zinc phosphate

cement.²⁷ According to this method, the cement is considered set when a 400 g weight loaded onto a Vicat needle with a tip diameter of 1 mm fails to make a perceptible circular indentation on the cement surface.

Particle release from cement surface

The cement cylinders were left to set at room temperature and humidity during: (i) 1 or 2 min after mixing for cements prepared with phosphoric and organic acids, respectively, (ii) half of final setting time (FST), and (iii) the FST. Afterwards, each sample was immersed in 5 ml of distilled water inside a 10-ml glass container kept at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h in a thermostatic bath under constant stirring (60 rpm). Five specimens were prepared for each combination of liquid/solid phase and setting time. After 24 h of incubation, the cement particles released to the liquid media inside the containers were collected using a Millipore membrane (Millipore Ibérica S.A., Madrid, Spain) with a pore size of $0.10 \mu\text{m}$ and analyzed by optical microscopy (Motic, Barcelona, Spain) and light scattering. Then, the Millipore membranes and cement cylinders were dried under vacuum and weighed. The percentage of weight loss was calculated from the cement specimen dried weight (P_w) and the released particles dry weight (P_r) as follows:

$$\text{Solid weight loss (\%)} = \frac{P_r}{P_w + C_w} \times 100$$

Measurement of mean particle size and zeta potential

Zeta potential, ζ , of particles released from the cement samples was measured in the ageing medium at 37°C using a Zetasizer Nano-S model Zen 1600 (Malvern Instruments Ltd., UK). Measurements were repeated five times and the average ζ potential was calculated. Mean particle size was measured at 25°C and represented as the mean value of five measurements.

Examination of cement microstructure

The effect of storage in water on the morphology of brushite cements was investigated by recording micrographs, using a scanning electron microscope (JSM6400 SEM), of cement fracture surfaces and of the filtered particles. Moreover, the microstructure of the set cements was analyzed by X-ray diffraction using a Philips X'pert diffractometer (Cu-K α radiation, 45 kV, 40 mA). Data were collected in the range $2\theta = 10^\circ$ and 80° with a step size of 0.03° , and a normalized count time of 3 s/step. The mineral composition of the cement was checked by means of structural model files of brushite (ICSD 016132),²⁸ β -TCP (ICSD 06191),²⁹ and monetite (ICSD 38129).³⁰ FTIR spectra of the set cement samples and the filtered released particles were recorded in transmission using a Perkin-Elmer 1720 with spectral resolution of 4 cm^{-1} and pressed KBr discs.

RESULTS

Cement FST

The cement FST was measured at room temperature and the results are presented in Figure 1. The cement prepared with phosphoric acid in the liquid phase sets in 1.5 min whereas the use of carboxylic acids increased the FST to 3.8, 7, and 16.6 min for tartaric, glycolic, and citric acids, respectively. The use of C4S and hyaluronic acid did not affect significantly the FST of the cement prepared with citric acid.

Particles released from cement surface

The investigation of the amount of particles released from the cement surface was performed using equal amounts of the storing medium to avoid differences in mass loss associated with the saturation of the medium by calcium ions.^{38,25} The superficial disintegration was lower in the cements made with 2M phosphoric acid and, on the contrary, cements prepared with citric acid had the highest weight loss percentage (Fig. 1). Within the carboxylic acid group, the cements set with 0.5M tartaric acid showed the lower percentage of weight loss. The superficial disintegration of cement pastes was also assessed after 1 (phosphoric acid) and 2 (carboxylic acids) min after starting the setting reaction and also after half of the FST. All cement pastes showed a higher superficial disintegration than in their corresponding set cement samples (Fig. 1). Phosphoric acid cement pastes possessed the lower solid weight loss percentage, followed by tartaric acid pastes. On

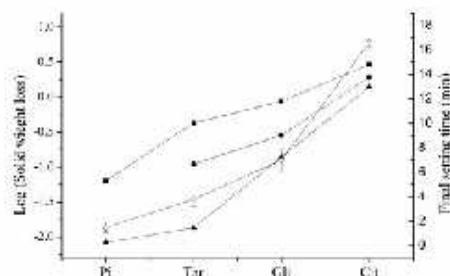


Figure 1. Solid weight loss of brushite cements made with phosphoric (Pi), tartaric (Tar), glycolic (Gly), and citric (Cit) acids after being aged for 24 h. The cements were incubated after 1 min for phosphoric acid and 2 min for organic acid (●), half of the FST (■) and the FST (▲). The cement FST was also represented (○).

TABLE I
 α -Hydroxy Acid Solutions' Viscosity, Mean Diameter and ζ Potential of Cement Particles
 in the Liquid Medium

Cement liquid phase	Viscosity (mPa s)	Diameter \pm SD (μ m)	ζ Potential (mean \pm SD) (mV)
0.5M Citric acid	3.1 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4	-8.8 \pm 0.4
1M Glycolic acid	4.1 \pm 0.7	2.6 \pm 0.7	-8.5 \pm 0.6
0.5M Tartaric acid	8.4 \pm 0.1	2.2 \pm 0.4	-10.5 \pm 0.9
0.5M Citric acid with 0.5% hyaluronic acid	17.3 \pm 0.5	2.7 \pm 0.2	-10.4 \pm 0.2
0.5M Citric acid with 0.5% chondroitin 4 sulfate	2 \pm 1	3.0 \pm 0.4	-9.9 \pm 0.6

the contrary, citric acid cement pastes had the highest solid weight loss percentage.

The investigation of the effect of C4S and hyaluronic acid on the cement disintegration was performed by adding a concentration of 0.5% (w/w) of these substances to the 0.5M citric acid liquid phase. Even though, the addition of hyaluronic acid increased considerably the viscosity of citric acid solution (Table I), both additives just induced a slight decrease in the solid weight loss of set cement samples. However, the decrease in superficial disintegration was pronounced in the cement paste prepared with hyaluronic acid (Fig. 2).

Measurement of mean particle size and zeta potential

As it can be seen in Table I, there were no significant differences, within the experimental error, between the mean size diameters and the ζ potentials of the cement particles released to the storing medium for the different liquid phases used in this study. Cement particle diameters expand a range between 2.22 and 3.00 μ m, while, zeta potentials are

comprised between -8.4 and -10.5 mV. Both, particle's diameter¹⁵ and surface zeta potential³¹ are determinant factors for the biological acceptance of the released material. It has been reported that low zeta potential favors osteoblast adhesion.³² The measured zeta potential of the released particles permits the anticipation of a good bonding with bone and osteoblast cells,³¹ whereas its small diameter points to a harmful effect on osteoblast cells.¹⁵

Structural analysis

The microstructure of the set cements was analyzed to obtain their mineral composition. As is illustrated in Figure 3, the strongest peaks in the X-ray diffractogram appeared at 2θ values 11.6°, 21°, 29.2°, 30.6°, 31°, 34.1°, and 34.3°. According to ICSD reference patterns,²⁸⁻³⁰ the samples were composed essentially of brushite and β -TCP. The cement prepared with phosphoric acid, after being aged in water, displayed a different diffraction pattern than the cements prepared with the other acids (Fig. 4).

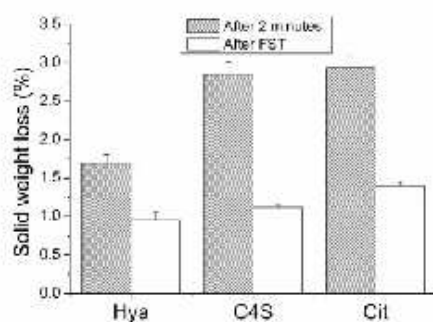


Figure 2. Solid weight loss of brushite cements made with citric acid in the presence of hyaluronic acid or C4S (0.5%, w/w).

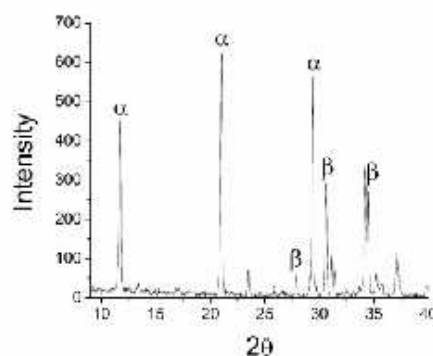


Figure 3. X-ray diffraction pattern of brushite cement set with citric acid. α and β correspond respectively to brushite and β -TCP characteristic peaks.

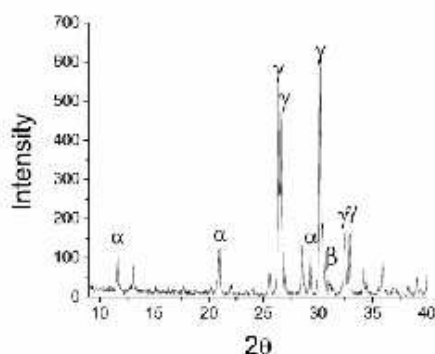


Figure 4. X-ray diffraction pattern of phosphoric acid brushite cement after being aged in water for 24 h. α , β , and γ correspond, respectively, to characteristic peaks of brushite, β -TCP, and monetite.

The analysis of the diffraction pattern using ICSD reference data revealed the presence of monetite within the cement matrix in addition to brushite and β -TCP. The excess of acidity in the cement prepared with phosphoric acid leads to the appearance of monetite in the cement matrix.³³

The ageing of the cement was also investigated using FTIR technique. Figure 5 shows the FTIR spectra of the cements prepared with the α -hydroxy and phosphoric acids before and after being aged for 24 h in water. The spectra of the cements prepared with citric and glycolic acid, before ageing, revealed the presence of two weak calcium carboxylate vibra-

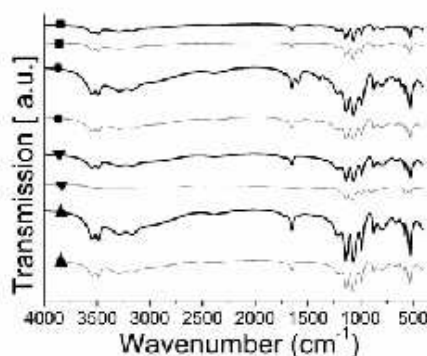


Figure 5. FTIR spectra of brushite cements before (thick traces) and after (thin traces) being aged in water. Brushite cements made with: citric acid (■), tartaric acid (●), phosphoric acid (▼), and glycolic acid (▲).

Journal of Biomedical Materials Research Part A DOI 10.1002/jbma

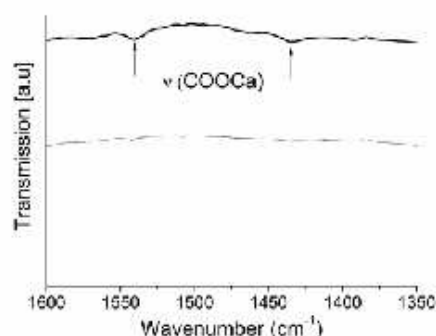


Figure 6. FTIR spectra of citric acid brushite cement before (thick traces) and after (thin traces) being aged showing the absence of calcium carboxylate vibration bands in the spectrum of aged brushite cement.

tion bands around 1589 and 1385 cm^{-1} , which are attributed to COO asymmetric and symmetric stretch, respectively. Both bands disappeared after the cements ageing (Fig. 6). By contrast, the calcium carboxylate vibration bands are present in the tartaric acid cement spectra, before and after being aged in water (Fig. 7). We attribute this difference to the water solubility of calcium carboxylate which follows the sequence: tartaric acid < glycolic acid < citric acid. The absence of OH stretch and H_2O bend bands in the FTIR spectrum of the aged brushite cement made with phosphoric acid indicates the presence of monetite in the cement matrix (Fig. 5).

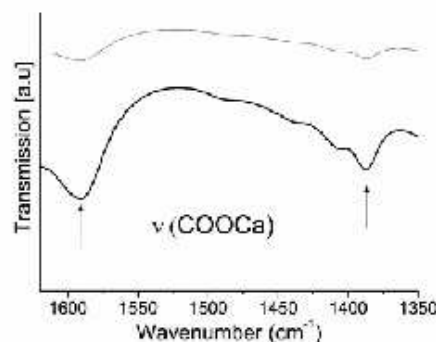


Figure 7. FTIR spectra of tartaric acid brushite cement before (thick traces) and after (thin traces) being aged showing the presence of calcium carboxylate vibration bands in the spectrum of aged tartaric acid brushite cement.

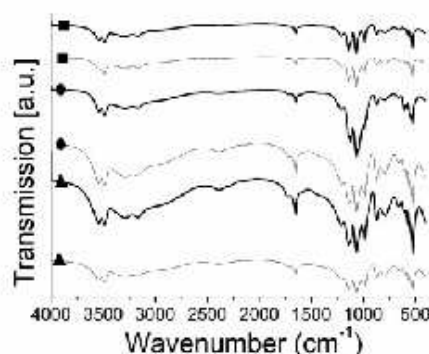


Figure 8. FTIR spectra of brushite cements before (thick traces) and after (thin traces) being aged in water. Brushite cements made with citric acid (■), citric acid modified with C4S (●) and citric acid modified with hyaluronic acid (▲).

As is shown in Figure 8 the incorporation of C4S and hyaluronic acid into citric acid solution did not affect the composition of brushite cements, as no differences were observed in the FTIR spectra of brushite cements made in the absence or the presence of C4S or hyaluronic acid.

Cement filtrate spectra were quite similar (Fig. 9). Vibration bands appeared around wave numbers of 554, 606, 945, 971, 1041, 1097, and 1119 cm^{-1} . These spectra are similar to hydroxyapatite and β -TCP spectra.^{34,35} While the ν_3 vibration band of the PO_4^{3-} of hydroxyapatite is observed around 1087 cm^{-1} , this vibration band is observed around 1120 cm^{-1} in β -TCP spectrum.³⁴ Accordingly, it could be concluded that the released particles were essentially made of β -TCP.

DISCUSSION

The DCPD structure consists of two parallel bilayers. One bilayer presents sheets of calcium and phosphate ions while the other bilayer is formed by water. In aqueous solutions, the hydrated layer is the terminating at the brushite crystal surface³⁶ due to the much higher concentration of water molecules compared to those of calcium and phosphate ions. Only at the edges where water layer is interrupted, calcium and phosphate ions are able to interact with the surrounding medium,³⁶ allowing the dissolution of these ions from brushite crystals to the medium with a rate that depends on the chemical equilibrium between dissolution and recrystallization.²² Hence,

the dissolution of brushite particles would allow the reprecipitation of brushite as HA.²³

An increase in the FST of carboxylic acids brushite cements in comparison with phosphoric acid brushite cement was found (Fig. 1). In a recent study,³⁷ the formation of an intermediate dicalcium phosphate-citrate complex was detected. The α -carboxylic group of the organic acids binds to the exposed calcium ion on brushite crystals,⁸ as indicated by the presence of calcium carboxylate vibration bands around 1589 and 1385 cm^{-1} (Figs. 5–8), which enable the carboxylic acids to work as inhibitors of DCPD crystal growth.^{8,10} Albeit, carboxylic acids were not significantly incorporated in the structure of the cement crystals,⁸ as indicated by the absence of calcium carboxylate vibration bands in cements spectra after ageing in water (Fig. 6).

For all the acids used in this study, it was found that the disintegrated particles were essentially β -TCP and present similar size and surface charge (Table I). Through calcium carboxylate interactions, organic acids may form a surface layer on β -TCP particles, thus, the water solubility of β -TCP may depend on the solubility of calcium carboxylate in water. A similar behavior was suggested to explain the reduction of calcium orthophosphate solubility rate using pyrophosphate ions.³⁸ Figure 1 shows that superficial disintegration decreases as follows: citric acid > glycolic acid > tartaric acid. The solubility of the calcium carboxylate increases following the sequence of tartaric acid, glycolic acid, and citric acid. Accordingly, it could be suggested that the more soluble the calcium carboxylate is the more β -TCP particles are released. The cement FST also seems to affect the β -TCP release from brushite

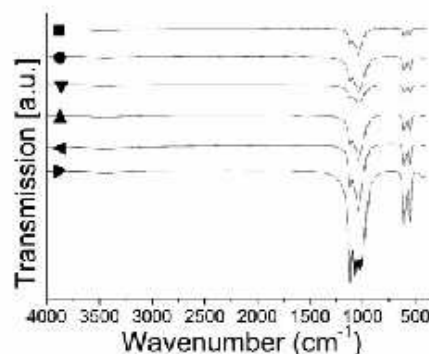


Figure 9. FTIR spectra of the filtrates of brushite cement made with citric acid (■), tartaric acid (●), phosphoric acid (▼), citric acid modified with C4S (▲), citric acid modified with hyaluronic acid (▶) and Glycolic acid (◄).

cement surface. As is illustrated in Figure 1, the longer FST leads to more β -TCP release from the cement surface.

It was also observed that cement pastes disintegrated more than do their corresponding set cement samples (Fig. 1). The cement particles are joined by physical forces: Attractive forces, like van der Waal forces, and repulsive forces, like double layer³⁹ and steric interactions.⁴⁰ Consequently, cement integrity could be affected by the equilibrium between these forces. Unlike set cement, the cement paste is a porous material where cement crystals are surrounded by a continuous liquid phase. The greater interparticle distance favors the disintegration of the β -TCP particles.

Two water-soluble polysaccharide compounds were added to increase the viscosity of citric acid aqueous solutions; namely, C4S (M_w : 29×10^3 Da) and hyaluronic acid (M_w : 1730×10^3 Da) in a concentration of 0.5% (w/w). Hyaluronic acid resulted more efficient in reducing citric acid cement paste disintegration (Fig. 2), an effect which was more pronounced in the cement paste than in the set cement samples. It is worth to note that the addition of hyaluronic acid increased the viscosity of citric acid solution more than that of C4S (Table I). Hyaluronic acid is a polymer made up of repetitive units of glucuronic acid and N-acetyl glucosamine. As each elementary unit is negatively charged, they repel each other producing an exceptionally long stretched out molecule of high molecular weight. Water soluble polysaccharides were used as viscosity-enhancing admixtures (VEAs) to enhance the cohesion and stability of cement-based systems. These VEAs increase the water retention capacity of the cement paste and reduce the risk of cement-paste heterogeneous separation.⁴¹ Nevertheless, the enhancement of cohesion using water soluble polysaccharide may depend on the concentration of the additive used. Indeed, an increase of the sodium hyaluronate concentration from 1.0% to 1.5% led to a dramatic decrease of the cement cohesion.¹

CONCLUSION

It was showed that solid particles disintegrated from the brushite cement surface were β -TCP. It also appears that the water solubility of the calcium carboxylate could affect the brushite cement cohesion. The method employed in this work has proved to be useful to study calcium cements cohesion.

The authors acknowledge the "Agencia Española de Cooperación Internacional" AECI for the provision of a scholarship to M. Hamdan. We also thank the service of CAL UCM for their help in X-ray diffraction and FTIR analysis.

References

1. Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 2005;26:6423-6429.
2. Apéti D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlrezyk K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer JA, von Rechenberg B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004;25:1439-1451.
3. Vereecke G, Lemaitre J. Calculation of the solubility diagrams in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$. *J Cryst Growth* 1990;104:820-832.
4. Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaitre J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996;30:193-200.
5. Munting E, Mirtchi AA, Lemaitre J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement an in vivo study. *J Mater Sci Mater Med* 1993;4:337-344.
6. Bohner M, Lemaitre J, Ring TA. Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of β -tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. *J Am Ceram Soc* 1996;79:1427-1434.
7. Gbureck U, Barralet JE, Spatz K, Grover LM, Thull R. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials* 2004;25:2187-2195.
8. Barralet JE, Tremayne M, Lilley KJ, Gbureck U. Modification of calcium phosphate cement with α -hydroxy acids and their salts. *Chem Mater* 2005;17:1313-1319.
9. Faleh TM, Blanco L, Lopez-Cabarcos E. The effect of carboxyl groups on the setting of brushite cement. In: *Proceedings of the Society for Biomaterials*. Philadelphia; 2004. Paper No. 28.
10. Hofmann MP, Lilley KJ, Gbureck U, Barralet JE. Carboxylic acids as brushite bone cement setting retardants. In: *Proceedings of the 19th European Conference on Biomaterials*. Naples; 2005. Paper No. P418 411.
11. Ishikawa K, Miyamoto Y, Kon M, Nagayama M, Asaka K. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement Composite with sodium alginate. *Biomaterials* 1995;16:527-532.
12. Fernandez E, Boltong MG, Ginebra MP, Driessens FCM, Bermudez O, Planell JA. Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements. *J Mater Sci Lett* 1996;15:1004-1005.
13. Khairoun I, Boltong MG, Driessens FC, Planell JA. Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res* 1997;38:356-360.
14. Andrianjatovo H, Lemaitre J. Effects of polysaccharides on the cement properties in the monocalcium phosphate monohydrate/ β -tricalcium phosphate system. *Innov Technol Biol Med* 1995;16:140-147.
15. Flolett DP, Takei H, Lin T, Van Landuyt P, Ma QJ, Kown SY, Sung KL. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials* 2000;21:1103-1114.
16. Verlaan JJ, Oner FC, Dhert WJ. Anterior spinal column augmentation with injectable bone cements. *Biomaterials* 2006;27:290-301.
17. Bernards CM, Chapman J, Mirza S. Lethality of embolized Norian bone cement varies with the time between mixing and embolization. In: *Proceeding of the 50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*. San Francisco; 2004. Paper No. 0254.
18. Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Poser RD. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res* 1998;43:451-461.

19. Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaître J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: Experimental study in sheep. *Bone* 1999;25:355-365.
20. Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaître J, Leroy G. Raman microspectrometry studies of brushite cement: In vivo evolution in a sheep model. *Bone* 1999;25:815-845.
21. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinaky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2005;26:4383-4394.
22. Xia Z, Grover LM, Huang Y, Adamopoulos IE, Gbureck U, Triffitt JT, Shelton RM, Barralet JE. In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line. *Biomaterials* 2006;27:4557-4565.
23. Grover LM, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2003;24:4133-4141.
24. Bohner M, Matter S. Brushite hydraulic cement stabilized with a magnesium salt. U.S. Patent 6733582 (2004).
25. Grover LM, Gbureck U, Wright AJ, Tremayne M, Barralet JK. Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro. *Biomaterials* 2006;27:2178-2185.
26. Amjad Z, Koutsoukos PG, Nancollas GH. The crystallization of hydroxyapatite and fluorapatite in the presence of magnesium ions. *J Colloid Inter Sci* 1984;101:250-256.
27. Xin Y, Ye F, Cai S, Yao K, Cui J, Song X. Gelatin manipulation of latent macropores formation in brushite cement. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:255-261.
28. Curry NA, Jones DW. Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate: A neutron-diffraction investigation. *J Chem Soc A* 1971:3725-3729.
29. Dickens B, Schroeder LW, Brown WE. Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. *J Solid State Chem* 1974;10:232-248.
30. MacLennan G, Beevers CA. The crystal structure of dicalcium phosphate, CaHPO_4 . *Acta Crystallogr C* 1955;8:579-583.
31. Smith IO, Baumann MJ, McCabe LR. Electrostatic interactions as a predictor for osteoblast attachment to biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:436-441.
32. Suzuki T, Nishizawa K, Yokogawa Y, Nagata F, Kawamoto Y, Kameyama T. Time-dependent variation of the surface structure of bioceramics in tissue culture medium and the effect on adhesiveness of cells. *J Ferment Bioeng* 1996;81:226-232.
33. Bohner M, Van Landuyt P, Merkle HP, Lemaître J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:675-681.
34. Peña J, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique. *J Eur Ceram Soc* 2003;23:1687-1696.
35. Linton JL, Sohn BW, Yook JI, Le Geros RZ. Effects of calcium phosphate ceramic bone graft materials on permanent teeth eruption in beagles. *Cleft Palate Craniofac J* 2002;39:197-207.
36. Flade K, Lau C, Mertig M, Pompe W. Osteocalcin-controlled dissolution-precipitation of calcium phosphate under biomimetic conditions. *Chem Mater* 2001;13:3596-3602.
37. Hofmann MP, Young AM, Gbureck U, Nazhat SN, Barralet JE. FTIR-monitoring of a fast setting brushite bone cement: Effect of intermediate phases. *J Mater Chem* 2006;16:3199-3206.
38. Fleisch H, Maerki J, Russell RG. Effect of pyrophosphates on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;122:317-320.
39. Chappuis J. A new model for a better understanding of the cohesion of hardened hydraulic materials. *Colloids Surf A: Physicochem and Eng Aspects* 1999;165:223-241.
40. Bohner M, Doebelin N, Baroud G. Theoretical and experimental approach to test the cohesion of calcium phosphate pastes. *Eur Cell Mater* 2006;12:26-35.
41. Khayat KH. Viscosity-enhancing admixtures for cement-based materials. *Cem Concr Compos* 1998;20:171-188.

12.2 20th European Conference on Biomaterials



Effect of carboxylic acids on brushite transformation to apatites

M. Hamdan^{1,2}, J. F.M. Tamimi^{1,2}, J. Blanco¹, E. López-Cabarcos²
¹Estomatología III, UCM, Madrid, Spain, 28040
²Fisico Química II, UCM, Madrid, Spain, 28040
 Email: mahmed@farm.ucm.es



Introduction

α -hydroxy acids have been used as inhibitors to the setting reaction of resorbable brushite calcium phosphate cements. Under physiological conditions, the metastable brushite phase transforms into hydroxyapatite (HA). Several factors were found to condition the in vivo DCPD transformation like local interstitial liquid turn over,¹ its protein constituents² and cement sample size.³ This undesirable transformation leads to increase the acidity of the surrounding medium and retards cement resorption. Low water soluble magnesium salts were proven to inhibit the growth of the newly forming HA crystal nuclei⁴ and pyrophosphoric acid was also reported to inhibit HA formation⁵. This study was conducted to determine the effect of α -hydroxy acids on the conversion of DCPD to HA.

Materials and methods

The cement solid phase, composed of β -tricalcium phosphate (β -TCP), monocalcium phosphate (MCP) and sodium pyrophosphate, was mixed for 30 s with distilled water and aqueous solutions of: 2M phosphoric acid, 1M glycolic acid, 0.5M tartaric acid, 0.5 citric acid in a P/L ratio of 2.5. Cement cylinders with an aspect ratio of 2 were left to set at room temperature and humidity. Cement final setting time (FST) was measured using Vicat needle test. Enthalpy measurements for the transformation of brushite $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ to monetite CaHPO_4 were performed (Mettler Toledo DSC820). The brushite cement cylinders were then aged in 5ml of phosphate buffered salt saline solution (PBS) at 37 °C for 1, 3, 14 and 28 days. The ageing medium was refreshed and the pH was measured every 24 h. After each observation period, the cement mineral composition was determined by means of Rietveld refinement of x-ray diffraction data (Philips X'pert diffractometer).

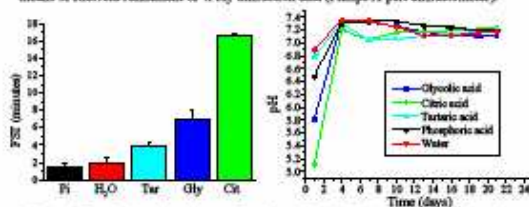


Fig. 1. The final setting time of brushite cements set with water, phosphoric (Pi), tartaric (Tar), glycolic (Gly) and citric (Cit) acids.

Results

Carboxylic acid solutions increased brushite cement FST in comparison with water brushite cement (see Fig. 1). Ageing medium pH converged from 5.1-6.8 after one day to pH 7.1-7.2 and never dropped more than pH 7.05 throughout the observation periods (see Fig. 2). Brushite cement DSC graphs possess three endothermic peaks. The first two peaks (below 200 °C) indicate the dehydration of brushite to monetite (DCF) while the third one (425 °C) indicates the decomposition of DCP to pyrophosphate ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). The brushite dehydration and DCP decomposition in DCPD cement set with phosphoric acid occurred at lower temperatures than the cements set with the other mixing liquids (see Fig. 3). The calculated enthalpy necessary for the dehydration of brushite crystals was higher in brushite cement modified with tartaric acid > glycolic acid > citric acid > water > phosphoric acid. Calcium-deficient apatites appeared as soon as 14 days in DCPD cements set with water and phosphoric acid brushite cements (see Table 1). But, it was not observed in DCPD cements set with glycolic, tartaric and citric acids till after 28 days (see Table 2). Monetite was detected in the cement set with phosphoric acid beyond one day (see Table 1).

Cement Liquid	Ageing time (days)	Cement composition (wt)			
		DCF	β -TCP	DCF	Apatites
Phosphoric acid	0	79	21	-	-
	1	92	2	6	-
	3	77	23	-	-
	14	69	26	-	5
	28	81	4	-	15
Water	0	74	26	-	-
	1	74	26	-	-
	3	75	25	-	-
	14	42	54	-	4
	28	58	28	-	14

Table 1. Mineral composition of brushite cements set with water and phosphoric acid after ageing in PBS for 0, 1, 3, 14, 28 days.

Cement Liquid	Ageing time (days)	Cement composition (wt)			
		DCF	β -TCP	DCF	Apatites
Citric acid	0	79	21	-	-
	1	66	34	-	-
	3	40	60	-	-
	14	34	63	-	-
	28	36	32	-	32
Glycolic acid	0	87	13	-	-
	1	81	19	-	-
	3	51	49	-	-
	14	54	41	-	-
	28	43	24	-	33
Tartaric acid	0	87	13	-	-
	1	85	15	-	-
	3	54	43	-	-
	14	52	48	-	-
	28	50	17	-	33

Table 2. Mineral composition of brushite cements set with citric, glycolic and tartaric acids after ageing in PBS for 0, 1, 3, 14, 28 days.

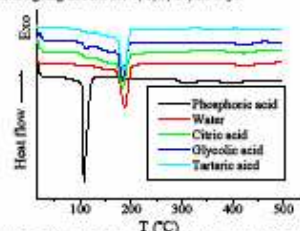


Fig. 3. DSC graphs of brushite cements set with water and phosphoric, tartaric, glycolic and citric acids.

Discussion

The maintenance of an appropriate pH for the DCPD conversion to HA did not result in an earlier appearance of HA within the cement matrix. DCPD transformation to HA is promoted by the maintenance of persistent calcium release from DCPD. The rate of calcium release is controlled by the liquid to cement volume ratio (LCVR).² Hydroxyapatite started to appear in water and phosphoric acid brushite cements earlier than carboxylic acid brushite cements (see Table 1 and 2). Through calcium-carboxylate complexation, carboxylic acid could inhibit the dissolution of calcium and phosphate ions and the formation of HA. It was proven that the addition of citric acid salt to β -TCP/MCP prevented the transformation of the reactants to monetite.⁶

Conclusion

The use of carboxylic acids in brushite cement preparation may be inhibitory to the transformation of brushite to hydroxyapatite.

References

- Constantz BR, Barr BM, Ison JC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Foser RD, J Biomed Mater Res. 1998;43:451-461.
- Grover LM, Knowles JC, Fleming GI, Barralet JE, Biomaterials. 2003;24:4133-4141.
- Flautre B, Delecoat C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaire J, Hardouin P, Bone 1999;25:353-358.
- Amjad Z, Koutsoukos PG, Nancollas GH, J Colloid Inter Sci. 1984;101:250-256.
- Grover LM, Gbureck U, Wright AJ, Tremayne M, Barralet JK, Biomaterials. 2006;27:2178-2185.
- Tenhuizen KS, Brown PW, J Mater Sci Mater Med. 1994;5:291-298.



12.3 Acta Biomaterialia

Available online at www.sciencedirect.com

Acta Biomaterialia 4 (2008) 664–670



Acta BIOMATERIALIA

www.elsevier.com/locate/actabiomat

Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements

M. Hamdan Alkhraisat^{a,b}, F. Tamimi Mariño^{a,b}, C. Rueda Rodríguez^b, L. Blanco Jerez^a,
E. López Cabarcos^{b,*}

^a *Departamento de Estomatología III, Facultad de Odontología, UCM, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040 Madrid, Spain*

^b *Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia, UCM, Plaza Ramón y Cajal S/N, 28040 Madrid, Spain*

Received 7 September 2007; received in revised form 20 November 2007; accepted 3 December 2007

Available online 31 December 2007

Abstract

In this study we report the synthesis of strontium-containing brushite cement with good cohesion and a diametral tensile strength (DTS) of 5 MPa. The cement powder, composed of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and monocalcium phosphate, was adjusted by different concentrations of strontium and pyrophosphate ions. The cement liquid phase was 2 M phosphoric acid solution. The cement cohesion and mechanical properties were measured after being aged in water for 24 h at 37 °C. It was found that at low concentration both strontium and pyrophosphate ions inhibit the cement setting reaction. However, the final setting time was significantly reduced when SrCl_2 increased from 5 to 10 wt.% at pyrophosphate concentrations equal to or higher than 2.16 wt.%. The incorporation of strontium ions did not increase the DTS of brushite cements significantly. In contrast, the addition of pyrophosphate ions did increase the DTS of brushite cements significantly. When both ions were added simultaneously, the brushite cement with a Sr^{2+} content of 5 wt.% had the highest DTS value. Nevertheless, the DTS values of Sr-containing cements were significantly reduced if the pyrophosphate concentration was higher than 2.16 wt.%. The Sr^{2+} ions had a negative effect on brushite cement cohesion, although the solid weight loss started to decrease at Sr^{2+} concentrations higher than 5 wt.%.

© 2007 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Brushite cement; Calcium phosphate cement; Pyrophosphate; Strontium; Diametral tensile strength

1. Introduction

Osteoconductive and biocompatible calcium phosphate grafts are widely used for the treatment of osseous defects caused by infection, tumors and trauma. A bone graft to function adequately must have a sufficient strength to withstand applied stresses and good cohesion, especially when used in highly blood-perfused regions. Calcium phosphate cements are classified as either hydroxyapatite or dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) cements according to their final product. These cements are too weak to be used in load-bearing areas, even though hydroxyapatite cements are stronger than brushite cements [1]. However, brushite

is metastable under physiological conditions [2] and in vivo studies have shown that brushite cement is highly resorbable [3]. Brushite crystal growth inhibition results in smaller-sized crystals, allowing them to pack closely together and improving brushite cement's mechanical properties. Furthermore, increasing brushite cement density improves the cement mechanical properties [4] by reducing the cement porosity that is inversely proportional to the cement strength [5]. This can be achieved by increasing the conversion of β -TCP to brushite [1,4].

Fractures caused by osteoporosis result in an estimated annual cost to the health services of around €30 billion in Europe [6]. At least one-third of people with osteoporosis and vertebral fractures suffer height loss, chronic pain and difficulties with normal daily activities [7]. There is increasing interest in the incorporation of strontium into calcium

* Corresponding author. Tel.: +34 913941751.

E-mail address: cabarcos@farm.ucm.es (E.L. Cabarcos).

phosphate cements that stems from its good results in treating osteoporosis [8–12]. The beneficial effects of strontium arise from its capacity to prevent bone loss since it was demonstrated that Sr^{2+} ions decreased the differentiation [8] and resorbing activity of osteoclasts in vitro [9]. In addition, Sr^{2+} increases osteoclast apoptosis [10] and enhances preosteoblastic cell proliferation and collagen synthesis [11]. Consequently, Sr^{2+} ions depress bone resorption and maintain bone formation. Furthermore, it has been reported that Sr-containing ionic cements are more osteoconductive than Zn-containing ionic cements [12].

It has been found empirically that extensive ion substitutions can occur in a crystal if the valence of the replacing ion is within one unit of that of the ion being replaced and if the radii of the two ions are similar. Calcium and strontium fulfill both requirements, and the two ions can occupy the same site in a crystal, as a result giving solid solution possibilities. The substitution of calcium by strontium has been studied in amorphous calcium phosphate, apatitic calcium phosphate, hydroxyapatite, octacalcium phosphate and DCPD [13]. The calcium substitution by strontium in DCPD was the most efficient, as all Ca sites in the DCPD lattice can be occupied by Sr atoms [13]. The incorporation of strontium causes a lattice expansion in hydroxyapatite crystal [14,15], increasing the dissolution of calcium and phosphate ions, and thus provoking the precipitation of a thicker apatite layer that bonds the graft to the bone [16]. Leroux et al. synthesized calcium strontium hydroxyapatite via the ionic calcium phosphate cement route [17]. However, the presence of a significant amount of nitrate-containing impurities prevents its further application. Novel Sr-containing hydroxyapatite cements without impurities in its final product have recently been developed [18].

Mineralization in biological systems is tightly regulated with respect to its timing and spatial aspects. Inorganic pyrophosphate is a potent and direct inhibitor for the crystallization in connective tissue matrices and urinary tract, and extracellular fluids [19–21]. Thus, local pyrophosphate exclusion or degradation [22] appears to be necessary for mineralization to be seeded in osteoblasts and in chondrocyte membrane-limited structures termed matrix vesicles (MVs) [19]. Pyrophosphate ions are added to toothpaste preparations designed to inhibit the formation of dental calculus [23]. The in vivo implantation of β -calcium pyrophosphate ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) has been shown to form a bond with bone without any intervening soft tissue [24].

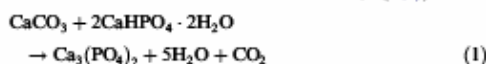
In calcium phosphate cements, pyrophosphate ions have been used as retardants to the setting reaction of brushite cements [25] since they bind to the nuclei of calcium salts, preventing the incorporation of ions into the crystal lattice and thus stopping the crystals from attaining a critical size that allows crystal growth and aggregation [23,26]. Furthermore, pyrophosphate ions may slow down the dissolution of β -TCP [4], whereas the increase in pyrophosphate concentration was associated with an increase in the tensile strength of brushite cements [25,27].

Herein, we report on calcium phosphate cements in which strontium and pyrophosphate ions were added with the aim of increasing the diametral tensile strength (DTS). For this purpose, cement cylinders (8 mm \times 4 mm) set at room temperature and humidity were aged in water for 24 h before being tested. Thereafter, the cohesion of Sr-containing cement with the highest DTS value was studied at different SrCl_2 concentrations.

2. Materials and methods

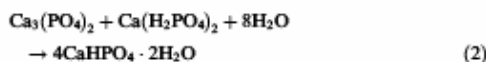
2.1. Material preparation

Monocalcium phosphate (MCP), calcium carbonate (CC), sodium pyrophosphate, DCPD (all from Sigma-Aldrich), strontium chloride (Merck) and phosphoric acid (Panreac) were used without further purification. The cement powder was composed of β -TCP (1.428 g), MCP (0.8 g), SrCl_2 (at concentrations of 0, 5 and 10 wt.%), and sodium pyrophosphate (at concentrations of 0, 0.54, 1.08, 2.16, 3.24, 4.32 and 5.4 wt.%). Beta-tricalcium phosphate (β -TCP) was synthesized by heating a stoichiometric mixture of CC and DCPD at 900 °C for 14 h (Eq. (1)):



The purity of β -TCP was tested by X-ray diffraction analysis. The mean diameter of the as-prepared β -TCP was $4 \pm 1 \mu\text{m}$.

The cement liquid phase was an aqueous solution of 2 M phosphoric acid. Of note, the combination of MCP and phosphoric acid in this study led to the stoichiometric composition of the cement phases. The cement phases were mixed using a spatula over a glass slab for 30 s in a powder to liquid (P/L) ratio of 4 g ml^{-1} . The cement setting reaction is given by:



2.2. Methods

A series of experiments with different powder to liquid ratios (data not shown) were performed to choose an adequate P/L ratio at 5 wt.% strontium and 2.16 wt.% pyrophosphate concentrations. The criteria were to select P/L ratio that results in cement with the highest DTS and final setting time (FST) that permits the evaluation of strontium and pyrophosphate effects. We selected a P/L ratio of 4 because lower ratios resulted in cement FSTs higher than 5–6 h and a lower DTS. On the other hand, higher P/L ratios (4.5, 5 and 5.5) resulted in a dry mixture without further improvement in the DTS.

Cement cylinders (8 mm \times 4 mm) were fabricated using polyethylene molds. The cements were tested for their FST according to the international standard ISO1566 for dental

zinc phosphate cement at room temperature and humidity (50–60%) [28]. After removing the polyethylene molds, the cement cylinders were aged in distilled water at 37 °C for 24 h to be tested for their DTS using pharma test PTB 311. At least five samples were prepared for each cement composition.

The solid weight loss was used as the parameter for testing cement cohesion [29]. The cements were made of 2.16 wt.% of pyrophosphate ions. The Sr^{2+} ion concentrations were 3, 5, 8 and 10 wt.%. The cement cylinders were left to set at room temperature and humidity. Afterwards, each sample was aged in 5 ml of distilled water at 37 ± 1 °C for 24 h under constant stirring (70 rpm). Three specimens were prepared for each cement formulation. Thereafter, the ageing medium was filtered using a Millipore membrane (Millipore Iberica S.A., Madrid, Spain) with a pore size of 0.10 μm . The Millipore membranes and cement cylinders were dried and weighed. The percentage of weight loss was calculated from the cement dried weight (Cw) and the released particles dry weight (Pw) as follows:

$$\text{Solid weight loss (\%)} = \frac{\text{Pw}}{\text{Pw} + \text{Cw}} \times 100$$

The mean size of particles released from the cement samples was measured in water at 25 °C using a Zen 1600 Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments Ltd., UK). Measurements were repeated five times to obtain the average mean size.

The phase analysis of the set cements recuperated from mechanical testing was performed by X-ray diffraction using a Philips X'pert diffractometer (Cu K α radiation, 45 kV, 40 mA). Data were collected in the interval between $2\theta = 10^\circ$ and 80° with a step size of 0.03° and a normalized count time of 3 s/step. The mineral composition of the cement was checked by means of structural model files of brushite (ICSD 016132) [30], β -TCP (ICSD 06191) [31] and monetite (ICSD 38128) [32]. Fourier transform infrared (FTIR) spectra were also recorded in transmission using a Perkin–Elmer 1720 with a spectral resolution of 2 cm^{-1} and pressed KBr discs. The cement fractured surfaces were examined by a scanning electron microscope (JSM6400 SEM).

3. Results

3.1. Cement characterization

The phase analysis of the set cements was investigated with X-ray diffraction. The diffraction patterns are shown in Fig. 1. The results obtained with the Rietveld refinement analysis (Table 1) showed that the cements are formed predominantly of brushite and a fraction of unreacted β -TCP. Monetite was also detected in various cement formulations. It is worth noting that the monetite phase was not observed in Sr-free cements and in Sr-containing cements with 2.16 wt.% pyrophosphate ions when aged for 24 h. As monetite is stable at acidic pH, the appearance of monetite is associated with an excess of acidity in the cement matrix [33].

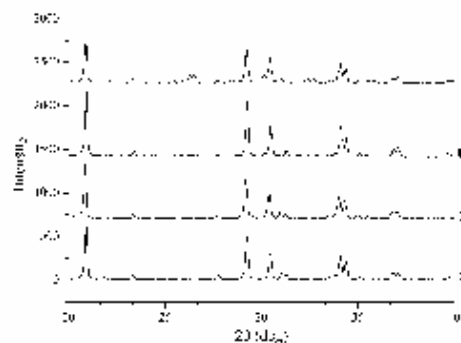


Fig. 1. X-ray diffraction patterns of brushite cements modified with 10 wt.% SrCl_2 (filled square); 5 wt.% SrCl_2 (filled circle); 10 wt.% SrCl_2 and 2.16% pyrophosphate (open square); 5 wt.% SrCl_2 and 2.16% pyrophosphate (open circle).

Table 1
The Rietveld refinement analysis of brushite cements modified with SrCl_2 and pyrophosphate

% SrCl_2 (w/w)	% P_2O_5 (w/w)	DCPD (%)	β -TCP (%)	DCP (%)
0	1.08	95	5	
0	2.16	90	10	
0	3.24	89	11	
0	4.32	89	11	
5	0	99	1	
5	0.54	87	5	8
5	1.08	86	6	8
5	2.16	90	10	
10	1.08	66	7	27
10	2.16	90	10	

The brushite lattice parameters increased with the increase in strontium content (see Table 2). As the ionic radius of strontium (1.13 Å) is higher than calcium (1.00 Å), the increase in the unit cell volume indicates that strontium is incorporated in the brushite crystal by substituting calcium. Thus, it can be reasonably inferred that Sr^{2+} provokes lattice distortions which expand the brushite crystal lattice.

It is worth mentioning that cements formed with pyrophosphate concentrations above 2.16% present a shiny surface at the air–solid interface that looks very different from the surface in contact with the walls of the cylindrical molds and from the bulk material. The structure of the shiny surface was investigated by FTIR and grazing incidence X-ray diffraction as the conventional Bragg–Brentano X-ray diffraction geometry has the disadvantage of bulk material interference. Furthermore, the grazing incidence X-ray diffraction was useful for evaluating the Fe-based amorphous alloy coatings [34]. The results are presented in Figs. 2 and 3, respectively. As can be seen in Fig. 2, the surface is composed of a great fraction of amorphous phase and a crystalline fraction predominantly of β -

Table 2
The lattice parameters of brushite crystals

% SrCl ₂ (w/w)	% P ₂ O ₅ (w/w)	Lattice parameters				
		a (Å)	b (Å)	c (Å)	B (°)	Volume (Å ³)
0	1.08	6.363881	15.18894	5.812595	118.5254	423.94
	2.16	6.365469	15.18514	5.810992	118.5327	421.18
5	0	6.363328	15.18824	5.812309	118.5302	422.15
	1.08	6.368801	15.19085	5.814294	118.5022	432.93
10	2.16	6.372349	15.19572	5.814715	118.5006	433.94
	0	6.370871	15.19321	5.814436	118.4933	436.35
	1.08	6.374845	15.20379	5.817653	118.4932	437.21
	2.16	6.375813	15.19972	5.815895	118.4758	443.12

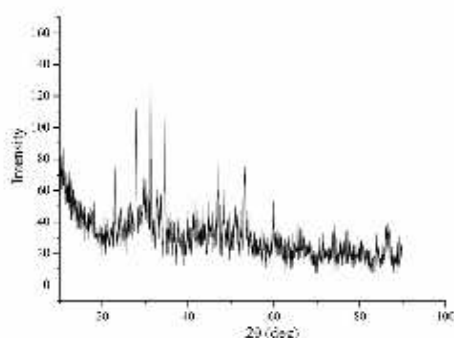


Fig. 2. X-ray diffraction pattern of the shiny surface of brushite cement with 5 wt.% strontium and 4.32 wt.% pyrophosphate ions.

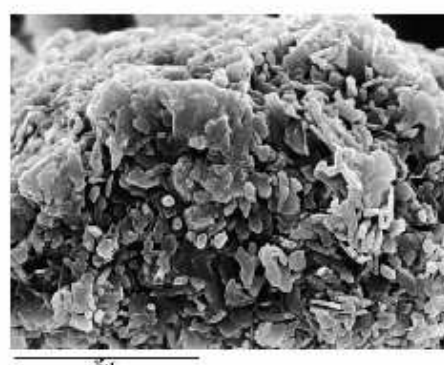


Fig. 4. SEM micrograph of brushite cement with 5 wt.% SrCl₂ and 0.54 wt.% pyrophosphate.

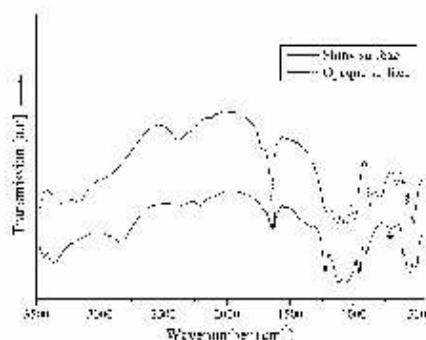


Fig. 3. FTIR spectra of the shiny and opaque surfaces of cement with pyrophosphate content of 4.32 wt.%. (*) P–O–P vibration band around 720 cm⁻¹.

TCP. The FTIR spectrum of the shiny surface has a peak around 720 cm⁻¹ which is characteristic of the stretching vibration of P–O–P bond [35], indicating the presence of calcium pyrophosphate dihydrate in the amorphous phase.

The morphology of the cements was further investigated using SEM. Micrographs of fractured surface of cements

with 5% strontium and 0.54% (Fig. 4) or 2.16% (Fig. 5) pyrophosphate, after compressive strength testing, show different crystal morphologies. The crystals are irregular in shape and size, and clusters of crystals can be distinguished (Fig. 4). Individual crystals had different shapes, namely: prismatic, with average length $3.1 \pm 0.8 \mu\text{m}$ and width $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (Fig. 5); small, circular crystals, with an average diameter of $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$; and plate-like crystals, with an average length of $5 \pm 2 \mu\text{m}$ and width of $3 \pm 1 \mu\text{m}$ (Figs. 4 and 5).

3.2. Brushite cement FST

Fig. 6 shows the FST of brushite cements at different concentrations of SrCl₂ and sodium pyrophosphate. It should be noted that both strontium and pyrophosphate ions had a significant influence on the cement FST. In pyrophosphate-free cements, the increase in the SrCl₂ concentration from 5% to 10% increased the cement FST from 1.8 to 8.3 min, while in Sr-free cement samples, sodium pyrophosphate concentrations of 0.54, 1.08, 2.16 and 3.24 wt.% present FSTs of 1.4, 2.7, 16 and 32 min, respectively. However, brushite cement with a pyrophosphate concentration of 5.4 wt.% set in 24 min. The simultaneous



Fig. 5. SEM micrograph of brushite cement with 5 wt.% SrCl_2 and 2.16 wt.% pyrophosphate.

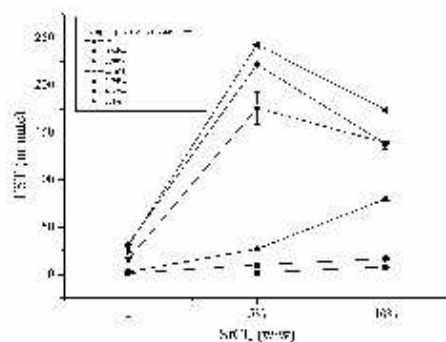
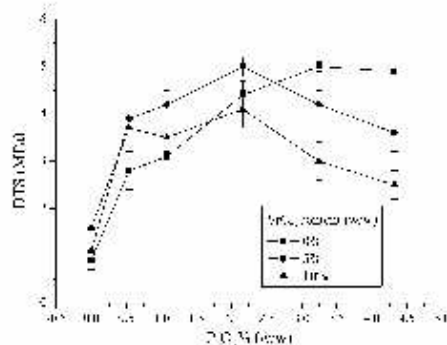


Fig. 6. The effect of strontium and pyrophosphate ions on the FST of brushite cements.

addition of both salts to the cement powder was more efficient in increasing the cement FST than their addition separately. As can be seen in Fig. 6, the FST reached 240 min for 5 wt.% SrCl_2 and 4.32 wt.% pyrophosphate. However, the FST was significantly reduced when SrCl_2 increased from 5 to 10 wt.% at pyrophosphate concentrations equal to or higher than 2.16 wt.%.

3.3. Diametral tensile strength

Fig. 7 shows the evolution of the DTS of cements as a function of pyrophosphate concentration for three different strontium contents. Strontium ions did not significantly increase the DTS of pyrophosphate-free brushite cements. In contrast, the DTS of Sr-free brushite cements was significantly improved by increasing the concentration of pyrophosphate ions. The addition of strontium at 5 wt.% was more efficient than at 10 wt.% in increasing the DTS of



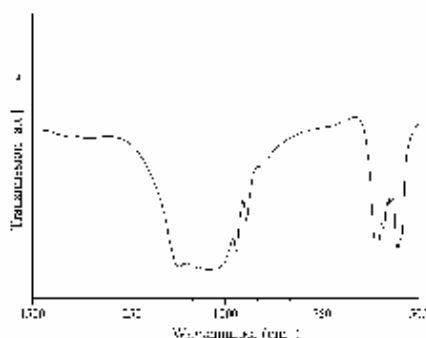


Fig. 9. FTIR spectrum of particles release from the surface of brushite cement with 3 wt.% SrCl_2 and 2.16 wt.% pyrophosphate content.

respectively. The FTIR spectrum of the dried cement filtrate is shown in Fig. 9. The spectrum has peaks around 554 and 606 cm^{-1} , corresponding to v_4PO_4 bands. The peaks around 945 and 971 cm^{-1} correspond to v_1PO_4 bands, and the peaks around 1041, 1097 and 1119 cm^{-1} correspond to v_3PO_4 bands. This clearly indicates that the composition of the released particles is β -TCP.

4. Discussion

The unit cell of DCPD contains four calcium and four phosphorus atoms [30]. The Ca and P atoms are linked to form corrugated sheets, where each two sheets are joined together by water molecules. All Ca sites in the crystal lattice are characterized by almost identical coordination [13]. As all Ca sites in the DCPD lattice can be occupied by Sr atoms, resorbable brushite cements could be used as a delivery system for strontium ions.

When used simultaneously, pyrophosphate and strontium ions are able to inhibit the cement setting reaction (Fig. 6). Pyrophosphate ions retard the setting reaction by inhibiting brushite crystal growth and the dissolution of β -TCP [4,26]. On the other hand, Sr^{2+} ions were reported to inhibit the rate of dissolution of hydroxyapatite and apatite deposition, as well as to retard calcium phosphate precipitation [14]. Thus, the presence of Sr^{2+} in the cement paste would inhibit the brushite setting reaction. However, when the cement content of strontium ions was above 5 wt.%, pyrophosphate concentrations as low as 2.16 wt.% significantly reduced the cement FST (Fig. 6). The FST was also reduced in Sr-free brushite cement at a pyrophosphate concentration of 5.4 wt.%. We attribute this effect to deposition of amorphous calcium pyrophosphate dihydrate crystals (Fig. 3), which may act as nuclei for brushite growth and accelerate the cement setting reaction. Sulfate concentrations above 0.1 M also decrease the brushite setting time. The calcium sulfate dihydrate formed was believed to act as nuclei for brushite growth, accelerat-

ing the setting reaction [25,27]. Moreover, the hydrolysis of the P–O–P bond in pyrophosphate ions to give two orthophosphate ions [36] may significantly increase the orthophosphate ion concentration, thus accelerating the cement setting reaction.

In Sr-free cements, the increase in pyrophosphate concentration resulted in higher DTS values (Fig. 7). This phenomenon parallels an increase in the cement FST. We attributed this effect to the slow growth of brushite crystals that results in small-sized crystals, allowing them to pack more closely and, thus, increase the DTS. Furthermore, cements with 5% SrCl_2 had a higher DTS than cements with 10% content (Fig. 7). The unit cell volume of brushite was higher in cements with 10% SrCl_2 than in cements with 5% (see Table 2). As the ionic radius of Sr^{2+} (1.13 Å) is larger than that of calcium ion (1.00 Å), the increase in the lattice parameters seems to support the strontium incorporation into brushite crystals. Strontium substitution for calcium expands and may destabilize brushite crystals. The lesser crystal defects may explain the higher DTS of the cement with 5 wt.% strontium content.

At 5 and 10 wt.% SrCl_2 concentrations, the increase in pyrophosphate content up to 2.16% increased the cement DTS. However, any further increase in pyrophosphate concentration reduced the DTS significantly. This could be related to the effect of the reduced FST on crystal growth and size. It worth noting that the conversion of brushite to monetite may affect the cement DTS. As monetite is denser than brushite, this transformation may increment the cement porosity, adversely affecting the cement DTS [37].

In a previous study we showed that the solid weight loss could be used to evaluate cement cohesion [29]. Herein, we studied the cohesion of cement with a pyrophosphate concentration of 2.16 wt.% at SrCl_2 concentrations of 0, 3, 5, 8 and 10 wt.%. The solid weight loss increased as SrCl_2 content increased up to 5 wt.% (Fig. 8). We associated this effect with the strontium substitution for calcium, which expands and destabilizes the brushite crystals, increasing their solubility. As a general rule, the higher the cement FST, the higher the solid weight loss [29]. Any further increase in SrCl_2 decreased the cement FST and thus decreased the cement solid weight loss. Moreover, the deposition of the less soluble DCPD (solubility product = $2 \times 10^{-19} \text{ mol l}^{-1}$ at 25 °C) on the surface of cements with pyrophosphate concentrations higher than 2.16 wt.% may reduce the β -TCP leakage to the ageing medium.

5. Conclusions

Strontium ions are successfully incorporated in brushite crystals. Both strontium and pyrophosphate ions have a synergistic retardant effect on the brushite cement setting reaction. The strength and cohesion values of these cements permit their application for bone repair in non-loading areas. Further research is necessary to address the effect of strontium ions on cement properties such as thermal characteristics, FST improvement and Sr^{2+} ion liberation. Further-

more, in vitro and in vivo experiments are necessary to characterize the biological properties of the cement.

Acknowledgements

This work was financially supported by DGI, Spanish Science and Education Ministry, contract grant number MAT2006-13646-C03-01 and the CAM-UCM Program (CCG06-UCM/SEM-1093). The authors acknowledge the "Agencia Española de Cooperación Internacional" for scholarship provision to Alkhraisat MH. We also thank the X-ray diffraction and SEM services of the UCM.

References

- [1] Grover LM, Gbureck U, Wright AJ, Barralet JE. Cement formulations in the calcium phosphate $H_2O-H_3PO_4-H_4P_2O_7$ system. *J Am Ceram Soc* 2005;88:3096–103.
- [2] Vereche G, Lemaire J. Calculation of the solubility diagrams in the system $Ca(OH)_2-H_3PO_4-KOH-HNO_3-CO_2-H_2O$. *J Cryst Growth* 1990;104:320–32.
- [3] Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaire J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996;30:193–200.
- [4] Grover LM, Gbureck U, Young AM, Wright AJ, Barralet JE. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-pyrophosphoric acid bone cement. *J Mater Chem* 2005;15:4955–62.
- [5] Ryschkewitch E. Compression strength of porous sintered alumina and zirconia. 9th communication to ceramography. *J Am Ceram Soc* 1953;36(2):65–8.
- [6] Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002;359(9319):1761–7, May 18.
- [7] Poole KE, Compston JE. Osteoporosis and its management. *BMJ* 2006;333(7581):1251–6, December 16.
- [8] Baron R, Tsouderos Y. In vitro effects of Si2911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 2002;450:11–7.
- [9] Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T. Si2911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 2003;18:1082–7.
- [10] Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone* 2006;38:S10–4.
- [11] Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salts Si2911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 1996;18:517–23.
- [12] Johal KK, Hill RG, Brook IM. In vivo response of strontium and zinc based ionic cement implants in bone. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:375–9.
- [13] Rokita E, Hermes C, Nolting HF, Ryzek J. Substitution of calcium by strontium within selected calcium phosphates. *J Cryst Growth* 1993;130:543–52.
- [14] Christoffensen J, Christoffensen MR, Kolthoff N, Barenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* 1997;20:45–7.
- [15] Okayama S, Akao M, Nakamura S, Shin Y, Higashikata M, Aoki H. The mechanical properties and solubility of strontium-substituted hydroxyapatite. *Bio-Med Mater* 1991;1:1–7.
- [16] Ni GX, Lu WW, Xu B, Chiu KY, Yang C, Li ZY, Lam WM, Luk KD. Interfacial behaviour of strontium-containing hydroxyapatite cement with cancellous and cortical bone. *Biomaterials* 2006;27:5127–33.
- [17] Leroux L, Lacout JL. Preparation of calcium strontium hydroxyapatites by a new route involving calcium phosphate cements. *J Mater Res* 2001;16:171–6.
- [18] Guo D, Xu K, Zhao X, Han Y. Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement. *Biomaterials* 2005;26:4073–83.
- [19] Anderson HC, Hsu HH, Morris DC, Fedde KN, Whyte MP. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol* 1997;151:1555–61.
- [20] Fleisch H. Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* 1978;13:361–71.
- [21] Fleisch H, Schibler D, Maerki J, Frossard I. Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature* 1965;207:1300–1.
- [22] Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 1984;231:1–8.
- [23] Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:1–11.
- [24] Katsugi T, Yamamoto T, Nakamura T, Kotani S, Kokubo T, Takeuchi H. Four calcium ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials* 1993;14:216–24.
- [25] Bohner M, Merkle HP, Landuyt PV, Trophard G, Lemaire J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:111–6.
- [26] Ryall RL, Harnett RM, Marshall VR. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* 1981;112:349–56.
- [27] Bohner M, Lemaire J, Ring TA. Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of β -tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. *J Am Ceram Soc* 1996;79:1427–34.
- [28] Xin Y, Ye F, Cai S, Yao K, Cui J, Song X. Gelatin manipulation of latent macropores formation in brushite cement. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:255–61.
- [29] Alkhraisat MH, Marino FT, Retama JR, Jerez LB, Lopez-Cabarcos E. Beta-tricalcium phosphate release from brushite cement surface. *J Biomed Mater Res A* 2007;DOI:10.
- [30] Curry NA, Jones DW. Crystal structure of brushite, calcium hydrogen orthophosphate dihydrate: a neutron-diffraction investigation. *J Chem Soc A* 1971:3725–9.
- [31] Dickens B, Schroeder LW, Brown WE. Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurities in β - $Ca_3(PO_4)_2$. The crystal structure of pure β - $Ca_3(PO_4)_2$. *J Solid State Chem* 1974;10:232–48.
- [32] MacLennan G, Bevers CA. The crystal structure of dicalcium phosphate, $CaHPO_4$. *Acta Crystallogr C* 1955;8:579–83.
- [33] Bohner M, Van Landuyt P, Merkle HP, Lemaire J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 1997;8:675–81.
- [34] Liu D, Gao W, Li Z, Zhang H, Hu Z. Electro-spark deposition of Fe-based amorphous alloy coatings. *Mater Lett* 2007;61:165–7.
- [35] Grover LM, Gbureck U, Wright AJ, Tremayne M, Barralet JE. Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro. *Biomaterials* 2006;27:2178–85.
- [36] Fleisch H, Maerki J, Russell RGG. Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol* 1966;122:317–20.
- [37] Bohner M, Lemaire J, Ring TA. In: Duran J, Fernandez JA. (Eds.) Third Euro Ceramics. Fernandez Faenza Editrice Iberica. Castellon de la palma 1995. p. 95–100.

12.4 8th World Biomaterials Congress



A novel monetite forming biocement

Alkhraisat MH^{1,2}, Moore CJ, Tamimi P, Blanco U, López-Cabaco E³, Barakat JE⁴, Gbureck U¹

¹Biomechanics III, Facultad de Odontología, UCM, Madrid, Madrid, Spain
²Odontología Pédica II, Facultad de Farmacia, UCM, Madrid, Madrid, Spain
³Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Wüzburg, Würzburg, Bavaria, Germany
⁴Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Introduction

Monetite is a promising biomaterial that support bone regeneration and degrades *in vivo* without the formation of HA [1], however, its preparation at high temperature could restrict its use as drug release matrix. There has been an increasing awareness about the biological role of strontium in osteoporosis treatment leading to its incorporation into calcium phosphates [2]. This provoked the formation of a thicker apatite layer that bonds the graft to the bone and promoted the growth and proliferation of osteoprecursor cells [3]. However, the release of Sr²⁺ ions from HA drops rapidly below therapeutic levels [4]. Herein, we report a novel calcium phosphate cement system comprising a strontium substituted β -tricalcium phosphate (β -TCP). The new cement shows an interesting strontium ions releasing profile.

Materials and methods

Sr-substituted β -TCPs ($\text{Ca}_{10-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_7$; $0 < x < 1.5$) were prepared by solid state reaction and reacted with primary monocalcium phosphate (MCPM, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and water to produce CPC. Cement setting reaction was characterized by measuring setting time, pH and heat evolution. Set cements were analyzed using X-ray diffraction and Rietveld refinement analysis. Compressive strength (CS) and strut densities of set brushite cements were determined.

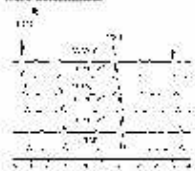


Fig. 1. X-ray diffraction patterns of β -TCP prepared with strontium substitution for calcium.

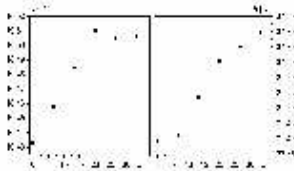


Fig. 2. Crystal Parameters *a* and *b* of Sr²⁺-substituted β -TCP according to Rietveld refinement analysis.

Results

Sr²⁺ ions were successfully introduced in the lattice of β -TCP as indicated by peak shift towards lower diffraction angles (Fig. 1). Interestingly, the intensity increase of diffraction peaks correspondent to crystal planes 1010 and 220 indicates a preferred direction of Sr- β -TCP crystal growth. Rietveld refinement analysis showed an almost linear evolution of the lattice parameter *b* (Figure 2) over the whole Sr/(Sr+Ca) range whereas the lattice parameter *a* showed no further changes above a degree of strontium substitution of 20%.

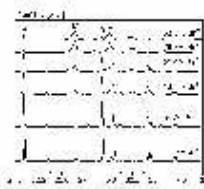


Fig. 3. X-ray diffraction pattern of CPC prepared with strontium substituted β -TCP.

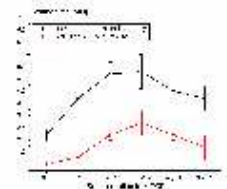


Fig. 4. Final setting time of CPC prepared with strontium substituted β -TCP.

The novel use of Sr substituted β -TCP successfully substitute Ca²⁺ ions by Sr²⁺ ions in secondary calcium phosphates (brushite and monetite). Interestingly, monetite was the main setting product in CPCs at higher Sr content. Furthermore, Sr²⁺ ions increased the cement final setting time.

Sr²⁺ ions slower the heat evolution of cement paste leading to lower maximum temperatures but maintained for longer period of time. Furthermore, they lowered the cement paste pH which maintained more acidic for longer time. The Sr²⁺ ions incorporation increased by three folds the radiopacity of secondary calcium phosphate cements. Meanwhile, the compressive strength and relative porosity were comparable with strontium-free cement.

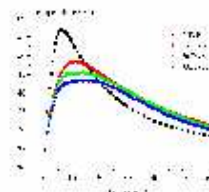


Fig. 4. Heat evolution of CPC prepared with strontium substituted β -TCP.

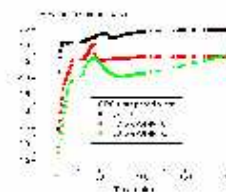


Fig. 5. pH of CPC prepared with strontium substituted β -TCP.

Table 1. Compressive strength (CS), density and relative porosity of CPC prepared with strontium substituted β -TCP.

Sr content in β -TCP	CS (MPa)	apparent density (g/cm ³)	strut density (g/cm ³)	Porosity (%)
0	5.0 \pm 1.0	1.37 \pm 0.07	2.82 \pm 0.01	51.3
6.7%	7.0 \pm 2.0	1.31 \pm 0.03	2.75 \pm 0.05	52.3
13.9%	5.0 \pm 1.0	1.30 \pm 0.07	2.72 \pm 0.03	52.2
20.0%	6.0 \pm 1.0	1.35 \pm 0.04	2.64 \pm 0.07	49.0
26.7%	6.0 \pm 1.0	1.40 \pm 0.05	2.96 \pm 0.02	52.7
33.3%	5.0 \pm 1.0	1.46 \pm 0.06	2.97 \pm 0.03	50.8



Fig. 6. Radiopacity of CPC prepared with strontium substituted β -TCP.

Discussion

The novel use of Sr substituted β -TCP induced strontium substitution in acidic cements. This resulted in the formation of monetite as the main setting product at higher strontium content probably due to longer time at maximum temperatures and more acidic cement paste. Furthermore, the slower calcium phosphate precipitation could also favor monetite formation [5]. Sr²⁺ ions retard CPC setting reaction most likely because Sr²⁺ ions retarded both the dissolution of β -TCP and the precipitation of brushite crystals.

Conclusions

1. A new approach for inducing ionic substitution within secondary calcium phosphate crystals was developed.
2. A novel monetite forming biocement was described.
3. The cements have a radiological and physico-chemical properties of great importance as a degradable bone graft.

References

1. Gbureck U, Hölzel T, Klammer U, et al. *Adv Funct Mater* 2007;17:3940.
2. Alkhraisat MH, Marifio FT, Rodriguez CR, et al. *Acta Biomater* 2008;4:664.
3. Xue W, Moore JL, Hosick HL, et al. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:B04.
4. Landi E, Tampieri A, Celotti G, et al. *Acta Biomater* 2007;3:961.
5. Grover LM, Gbureck U, Young AM, et al. *J Mater Chem* 2005;15:4955.

12.5 Submitted to Biomaterials

Strontium modified biocements with zero order release kinetic

M. Hamdan Alkhraisat^{1,2}, C. Moseke³, L. J. Blanco², J. E. Barralet⁴, E. Lopez-Carbacos¹, U. Gbureck³

¹ *Departamento de Química Física II. Facultad de Farmacia, UCM, 28040 Madrid, Spain*

² *Departamento de Estomatología IIII. Facultad de Odontología, UCM, 28040 Madrid, Spain*

³ *Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, University of Wurzburg, 97070 Wurzburg, Germany*

⁴ *Faculty of Dentistry, McGill University, Montréal, Québec, H3A 2B2, Canada*

Correspondence to: U. Gbureck; e-mail: uwe.gbureck@fmz.uni-wuerzburg.de

Abstract

Strontium substituted β -TCP with the general formula $\text{Ca}_{(3-x)}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_2$ ($0 < x < 1$) was synthesized by calcination of powder mixtures with the appropriate stoichiometry and reacted with acidic monocalcium phosphate monohydrate (MCPM) to form a matrix of secondary calcium phosphates. Sr-substituted β -TCP induced strontium substitution in the setting products; an increasing amount of strontium ions in β -TCP favored the formation of monetite (CaHPO_4) as setting product, whereas Sr-free cements set to brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot x \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Release experiments under dynamic conditions for up to 15 days revealed the release of Sr^{2+} doses in the range of 12-30ppm with a zero order kinetic. Cement biocompatibility was investigated by culturing human osteoblast cell line hFOB1.19 on cement surfaces indicating matrix suitability for osteoblast cell growth and proliferation.

Keywords: brushite; monetite; bone cement; calcium phosphate; strontium substitution, osteoblast, biocompatibility.

Introduction

Osteoporosis is a metabolic disease that results from reduced bone mass and disruption of the micro-architecture of bone, giving decreased bone strength and increased risk of fracture [1]. Osteoporotic fractures may increase disability and mortality risks and cause difficulties with normal daily activities. Current pharmacological medications of osteoporosis include the use of bisphosphonates, selective estrogen receptor modulators or strontium ranelate [2]. Strontium ions have been proved to be useful in osteoporosis treatment as they both favour bone formation by stimulating pre-osteoblast cell replication with an increase of matrix synthesis as well as strontium suppresses bone resorption due to an inhibition of osteoclast differentiation and activity [3, 4, 5]. Sr^{2+} incorporation in synthetic calcium phosphate bioceramics may therefore improve their osteointegration due to osteoblast stimulation and osteoclast inhibition after strontium release. Various studies are related to this topic by either substituting the crystal lattice of sintered calcium phosphates (hydroxyapatite, tricalcium phosphate) during high temperature synthesis [6] or introducing strontium ions by precipitation during a setting reaction of hydroxyapatite forming cements [7]. However, hydroxyapatite ceramics are only marginal soluble at a physiological pH-value such that Sr^{2+} release from these materials is low, e.g. Landi et al. synthesized a strontium substituted hydroxyapatite with 8.7 wt% strontium content with an in vitro Sr^{2+} ions release of 6.060 ppm after 24h decreasing to 0.602 ppm on day 7 [8]. Since HA based ceramics are degraded in vivo via osteoclasts which are in turn inhibited by the released Sr^{2+} ions, the release of Sr^{2+} from HA based materials into the surrounding bone tissue is expected to be only marginal.

At low $\text{pH} < 4.2$, orthophosphate is protonated and the secondary calcium phosphates monetite (CaHPO_4) and brushite ($\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) are stable, their higher solubility at physiological pH is used in degradable brushite cement bone grafts. Brushite cements are commonly produced by

beta tricalcium phosphate (β -TCP)-monocalcium phosphate monohydrate (MCPM) [9] or β -TCP-phosphoric acid systems [10] and were ionically modified with strontium for controlled release [11]. Compared with hydroxyapatite forming bioceramics, the higher chemical solubility of the secondary phosphates should result in the release of higher strontium doses independent of osteoclast activity. In order to introduce Sr^{2+} ions into brushite cement there are essentially two approaches, firstly by using a soluble strontium salt in the manner of [11] and secondly to use strontium substituted reactants for cement formation. The first approach is associated with the problem of a high anion (chloride) concentration of the soluble salt which alters cement composition such that this approach is limited to low strontium concentrations $< 10\%$.

This study aimed to follow the second approach by using strontium substituted β -tricalcium phosphate as cement reactant. Although this compound has previously been described by Bigi et al. [34] and Kannan et al. [12] who prepared β -TCP at different degrees of Sr^{2+} substitution by either a solid state reaction of appropriate mixtures of β -TCP and $\alpha\text{-Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ or wet chemical precipitation synthesis, it was not yet used as a reactant in brushite forming biocement. Investigations were performed to discover firstly whether Sr-substituted β -TCP would form a Sr^{2+} substituted secondary calcium phosphate matrix and the relationship between Sr^{2+} content in the reactants and products was determined. Secondly, the capacity for a strontium substituted secondary calcium phosphate cement matrix to act as a controlled release system was evaluated as well as the effect of dissolution products on bone cell activity and growth was investigated.

Materials and Methods

β -TCP was prepared by sintering CaHPO_4 and CaCO_3 in a molar ratio of 2.15:1 at 1400°C for 12 h followed by 6 h at 1000°C . Sr-substituted β -TCPs with the general formula $\text{Ca}_{3-x}\text{Sr}_x(\text{PO}_4)_2$ with $0 < x < 1$ were prepared by replacing CaCO_3 with SrCO_3 exploring a molar $\text{Sr}/(\text{Sr}+\text{Ca})$ range

of 0-33%. The sintered cake was crushed and sieved with 355 μm pore size-mesh followed by ball milling for 10 minutes at 200 rpm. Brushite cements were produced by mixing the TCP powder in an equimolar ratio with MCPM in a coffee grinder following mixing these powders with water at a constant powder to liquid ratio (PLR) of 3.0 g/ml for all experiments unless otherwise stated.

Cement cuboids with an aspect ratio of 2:1 (12 x 6 x 6 mm) were prepared using silicone rubber molds and aged in double-distilled water at 37 °C for 24 h prior to testing. Compressive strength testing was performed at a crosshead speed of 1 mm/min using a static mechanical testing device Zwick 1440 (Zwick, Ulm, Germany) with a 5 kN load cell. The initial setting times of the cements were measured in a humidity chamber at 37°C and >90 % humidity and in normal laboratory atmosphere (20-23°C and 50–60% humidity) using the Gilmore needle test with a needle of 113.98g and 2.117mm diameter according to ASTM standard [13]. The pH-values of cement pastes were measured at a P/L ratio of 3 g/ml for up to 6h using a cut-in pH electrode (Mettler-Toledo, Germany). The strut densities of dried cement products were determined using helium pycnometry (10 purges, 10 runs; Accupyc 1330, Micromeritics, Bedfordshire, UK). These data combined with mass and dimension measurements of dried cylindrical samples enabled calculation of relative porosity of the cement.

X-ray diffraction patterns were recorded on a D 5005 diffractometer (Siemens, Karlsruhe Germany). Data were collected from $2\theta=20-40^\circ$ with a step size of 0.02° and a normalized count time of 1 s/step using Cu K_α radiation. Changes of the lattice parameters of Sr^{2+} -substituted β -TCP were determined with Rietveld refinement analysis (TOPAS 2.0, Siemens, Germany). Sr^{2+} ions release from set cement samples was measured daily following immersion of one sample (12 x 6 x 6 mm) into 5ml deionized water with a change of the immersion liquid

after every measurement (dynamic mode). The Sr^{2+} and Ca^{2+} concentrations were determined by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS, Varian, Darmstadt, Germany) against standard solutions of 5000 and 10000 ppb (Merck, Darmstadt, Germany).

The human osteoblast cell line hFOB1.19 [14] was cultured in DMEM/NUT MIX F-12 (HAM, Invitrogen Life Technologies). The cells were incubated with culture media supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin and streptomycin, respectively (Invitrogen Life Technologies) in a humidified 5% CO_2 incubator at 37°C. For biocompatibility testing the cement samples were prepared with β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP and 33.3%-Sr- β -TCP. The cements were washed with doubled distilled water until no change in the pH was measured and left to dry at room temperature. Samples sterilization was performed in 70% ethanol. Samples were placed in triplicate into a 24-well plate (Nunc, Wiesbaden, Germany), cells were seeded onto CPCs and polystyrene surfaces with an initial density of 50 000 cells per well. Cell proliferation and cell viability were determined after 3, 5, 7, and 10 days of culture. Cell proliferation was measured by electronic cell counting using a CASY 1 TTC cell analyzer (Schärfe System, Reutlingen, Germany). For this purpose, cells were detached by incubation with Accutase (PAA, Cölbe, Germany) after two washes in PBS. The reaction was stopped by adding equal amounts of DMEM. After diluting the cell suspension 1:100 in 10 ml Isoton III (Beckmann Coulter, Krefeld) cells were counted and the number was calculated automatically by the Casy-stat software (Schärfe System, Reutlingen, Germany). Cell viability and proliferation was analysed by using cell proliferation reagent WST 1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After incubating the cells for 30 min with the WST reagent 1:10 in DMEM at 37°C, the adsorption of the supernatant was quantified in a Tecan spectra fluor plus photometer (Tecan, Crailsheim, Germany). For each analysis the samples were examined in triplicate and the average and standard deviation was calculated. The results were analyzed with

two-way analysis of variance ANOVA (Origin 7.1). Accordingly, all pairwise multiple comparison procedures were performed using Tukey test ($P < 0.05$) for the comparison among individual means of the test groups.

Results

The X-ray diffraction analysis of β -TCP powders revealed a shift in the diffraction patterns to a lower diffraction angles as Sr-substitution is increased (Figure 1). β -TCP diffraction patterns also showed an increase in the intensity of the peaks at 25.92° and 34.5° (corresponding to 1010 and 220 crystal planes, respectively) as Sr content in β -TCP is increased indicating a preferred direction of growth of β -TCP crystals during calcination. Rietveld refinement analyses of the XRD data showed an almost linear evolution of the lattice parameter b (Figure 2) over the whole Sr/(Sr+Ca) range whereas the lattice parameter a showed no further changes above a degree of strontium substitution above 20%. The X-ray diffraction patterns of the set cements (Figure 3) showed that the cement matrix was composed predominantly of brushite, monetite and unreacted β -TCP. However, the remaining unreacted β -TCP was observed to decrease with higher strontium substitution as indicated by the absence of β -TCP diffraction peaks at higher substitution values (Figure 3). Moreover, this was parallel to an increase in the monetite phase within the cement matrix which was the main constituent of cements prepared with 26.7% and 33.3%-Sr- β -TCP. In Sr-containing cements, the diffraction peaks of brushite and monetite suffered a shift towards lower diffraction angles indicating an increase in the unit cell volume of brushite and monetite crystals due to Sr^{2+} incorporation in the crystal lattice (Figure 3).

After mixing, the cement pH started to increase rapidly until it reached a first plateau. After the occurrence of the maximum pH, it took 10 minutes for the cement paste prepared with β -TCP to reach the second minimum pH with a difference of 0.14 (Figure 4B). This time was increased

for Sr-containing cements to 16 minutes for a pH difference of 0.45 and 38 minutes for a pH difference of 0.56, for cement pastes prepared with 13.3% and 33.3%-Sr- β -TCP respectively. The pH value of the second plateau of β -TCP cement paste was 5.46, 4.7 and 4.74 for cement pastes prepared with β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP and 33.3%-Sr- β -TCP, respectively.

Sr-substituted β -TCP increased significantly the cement FST to a value that matches the requirement for clinical applications (Figure 4A). However, the setting reaction was accelerated by cement paste storage at 37 °C and > 90% humidity. Table 1 shows that strontium substituted β -TCP (Sr- β -TCP) did not negatively affect the compressive strength of cements prepared in β -TCP-MCPM-H₂O system. The compressive strength of all cement formulations was found to be in the range 5-7MPa at a constant powder to liquid ratio of 3.0g/ml (Table 1) independent of the degree of strontium substitution of the β -TCP. Furthermore, no significant difference in the densities and hence the porosities of brushite cements made in the β -TCP-MCPM-H₂O system were found.

Cement ageing in water to determine Sr²⁺ release was done in a dynamical mode where the ageing medium was refreshed every 24 h. Figure 5 indicates that Ca²⁺ concentration in the ageing medium was approx. 40-80 ppm for all studied cement formulations, whereas the released Sr²⁺ concentrations per day were increasing with an increasing Sr²⁺ content of the materials from approx. 10ppb (6.7% Sr- β -TCP) to 30 ppm (33.3 % Sr- β -TCP) (Figure 4). After an initial burst, ion release was nearly constant over the measurement period of 14d. Figure 6 shows the X-ray diffraction pattern of various cements after being aged for 15 days in a dynamic mode. The appearance of hydroxyapatite (HA) and monetite was observed in strontium free-brushite cement, whereas in Sr-containing cements, an increase in brushite peaks intensity and a

decrease in monetite peaks intensity was observed. HA was not detected within the Sr containing cements.

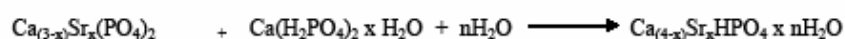
Biocompatibility tests with the Human osteoblast cell line hFOB1.19 proved that Sr-containing cements are as good as Sr-free cements in providing a template for cell growth and function. Figure 7 shows that the cell activity was increasing significantly until it reached a maximum on day 5 and day 7 before decreasing on day 10. The differences in cell activity between Sr-free cement and Sr-containing cements were not statistically significant. Although cell proliferation was increasing up to 5 days of cell culture, the differences in cell proliferation between different CPCs and time parameters were not statistically significant.

Discussion

Ionic substitution in ceramic biomaterials can alter materials properties like crystallinity, solubility and biological performance. [15, 16] Most prominent example is calcium substitution by zinc, magnesium and strontium in hydroxyapatite ceramics to modify solubility and the in vivo behaviour of the material [17, 18, 19, 20]. Strontium substitution is beneficial since Sr^{2+} ions are known to stimulate osteoblast like cells and are hence be useful to treat osteoporosis. Ionic substitution of the crystal lattice can be either achieved during high temperature synthesis of sintered calcium phosphate (hydroxyapatite, tricalcium phosphate) or by precipitation during a calcium phosphate cement setting reaction. The latter was described by Saint-Jean et al. [7] who modified an apatite cement by using Sr^{2+} -substituted α -tricalcium phosphate as cement raw material. The major disadvantage of these Sr^{2+} -modified apatite ceramics is their low chemical solubility in vivo and hence only low doses of the ionically substituted Sr^{2+} would be released into the surrounding tissue, this behaviour is demonstrated by previous studies of Landi et al. [8]

where the Sr^{2+} release of a modified HA ceramic with 8.7% Sr-content (prepared by precipitation) was below 1ppm after 7d immersion in a physiological solution.

Higher quantities of released strontium ions are obtained by ionic substitution of more soluble secondary calcium phosphate phases as demonstrated in this study for a degradable brushite forming biocement, which sets according to equation 1:



This new approach was successful in inducing strontium substitution for calcium in secondary calcium phosphate crystals. The X-ray diffraction patterns of the β -TCP starting materials and set CPCs showed a shift to lower diffraction angles as the ionic radii of strontium ions are higher than calcium ions (Figure 1 and 3) as well as increasing lattice parameters a and b of the β -TCP structure (Figure 2). Surprisingly, Sr^{2+} altered the composition of the setting product, while at low concentrations mainly brushite was found in X-ray diffraction analysis, a higher Sr^{2+} -content of >20atom% resulted in the formation of monetite as main setting product. The reason for monetite formation is probably related to changes of the pH-value in the cement pastes. Figure 4 shows that lower pH values are maintained for a longer period of time by higher Sr-content in β -TCP and it is known from other studies that this excess of acidity in the cement paste as well as a lower rate of calcium phosphate precipitation favours the formation of monetite in a cement matrix [21, 22].

Release experiments under dynamic conditions with a repeated change of the elution medium clearly demonstrated the release of the incorporated Sr^{2+} ions into the medium (Figure 5) and confirmed the hypothesis of a higher release rate from secondary calcium phosphate phases.

Initial Sr^{2+} concentrations in the medium were found to be in the range of 38-58ppm depending on the Sr^{2+} content of the cement, which decreased to approx. 12-30ppm after two days. In contrast to Sr^{2+} -modified hydroxyapatite ceramics [8], this level of ion release was maintained during the 14d of the release experiment indicating a zero order release kinetic. Therapeutic Sr^{2+} doses (as strontium ranelate) are in the range of 2.4 - 8.75 mmol/kg/day for oral administration [3]. Animal studies in rats indicate that these doses raise the Sr^{2+} plasma level to approx. 2-18mg/l [23] which is in the range of the released ion concentrations of this study.

The release experiment also altered the phase composition of the matrices and HA was detected in the cement matrix of Sr-free CPC aged in the dynamic mode (Figure 6). This conversion of brushite cement into HA was described before and was attributed to the absence of rapid fluid turnover which leads to a saturation of the pore liquid with respect to HA following re-precipitation [24]. Moreover, it was reported that the maintenance of a higher rate of brushite dissolution, by ageing medium renewal, favours HA formation [25]. This phase transformation was not observed for the Sr^{2+} -modified cements. This has mainly two reasons, firstly strontium was reported to have an inhibitory effect for HA crystallisation [26] and may therefore suppress phase transformation and secondly, the matrices are composed of predominately monetite at higher degrees of Sr^{2+} substitution. It has recently been shown by our group that monetite degrades in vivo without the formation of a low soluble HA phase, since the solubility of monetite is not sufficient to obtain saturation of the pore liquid with respect to HA [27].

Biocompatibility tests in the current study proved that Sr-containing cements are as good as Sr-free cements in providing a template for cell growth and function (Figure 7). The effect of Sr^{2+} on osteoblast cells was proved to be dose dependent [28], low doses of Sr^{2+} e.g. 0.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$ were shown to impair primary osteoblast differentiation. However, higher Sr^{2+} concentration e.g.

20 and 100 $\mu\text{g/mL}$ inhibited the formation of hydroxyapatite. In a previous study [29], Sr-HA with 10 mol% was cultured with osteoprecursor cells (OPC1). Sr-HA promoted better OPC1 cell attachment and proliferation. Moreover, strontium ions enhance preosteoblastic cell proliferation and collagen synthesis [29]. Herein, strontium containing cements were as good as Sr-free cements in providing support for osteoblast cells proliferation.

Conclusions

A new approach for inducing ionic substitution within secondary calcium phosphate crystals and a novel monetite forming biocement was reported. This has a tremendous potential in the field of degradable bone grafts with regard to a constant degradation and localized strontium ion release of the grafting material. Although brushite cements have often been shown to degrade in vivo, brushite can transform into HA slowing down resorption speed. In contrast, it was recently demonstrated that monetite based ceramics do not show this behaviour and hence have a more reliable degradation ability compared with brushite based bone grafts.

Acknowledgements

The authors acknowledge the “Agencia Española de Cooperación Internacional” for scholarship provision to M. Hamdan Alkhraisat and DGI, Spanish Science and Education Ministry; contract grant number: MAT2006-13646-C03-01.

References

- [1] Poole KE, Compston JE. Osteoporosis and its management. *BMJ* 2006;333:1251-1256.
- [2] Burler N, Reginster JY. Strontium ranelate. *Clin Orthop Rel Res* 2006; 443: 55-60.
- [3] Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int* 2001; 69: 121-129.
- [4] Baron R, Tsouderos Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 2002;450:11-17.

-
- [5] Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salts S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 1996;18:517-523.
 - [6] Bigi A, Foresti M, Gandolfi M, Gazzano M, Roveri N. Isomorphous substitutions in β -tricalcium phosphate: the different effects of zinc and strontium. *J Inorg Biochem* 1997; 66:259-265.
 - [7] Saint-Jean SJ, Camire CL, Nevsten P, Hansen S, Ginebra MP. Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted α -TCP cements. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16: 993-1001.
 - [8] Landi E, Tampieri A, Celotti G, Sprio S, Sandri M, Logroscino G. Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomater* 2007;3:961-9.
 - [9] Lemaitre J, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industriels* 1987;10:141-146.
 - [10] Bohner M, Lemaitre J, Ring TA. Effects of sulfate, pyrophosphate and citrate ions on the physiochemical properties of cements made of β -tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. *J Am Ceram Soc* 1996;79:1427-1434.
 - [11] Alkhraisat MH, Mariño FT, Rodriguez CR, Jerez LB, Cabarcos EL. Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cement. *Acta Biomater* 2008, doi:10.1016/j.actbio.2007.12.001.
 - [12] Kannan S, Pina S, Ferreira JMF. Formation of strontium-stabilized β -tricalcium phosphate from calcium-deficient apatite. *J Am Ceram Soc* 2006;89:3277-3280.
 - [13] ASTM-Standard C266-99: Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gilmore needles, ASTM International 2002.
 - [14] Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995;10:178-186.
 - [15] Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N, Shah JS. The role of magnesium on the structure of biological apatites. *Calcif Tissue Int*. 1992;50:439-444.
 - [16] Arsenault AL, Grynpas MD. Crystals in calcified epiphyseal cartilage and cortical bone of the rat. *Calcif Tissue Inter* 1988;43:219-225.
 - [17] Mayer I, Apfelbaum F, Featherstone JD. Zinc ions in synthetic carbonated hydroxyapatites. *Arch Oral Biol* 1994;39:87-90.
 - [18] LeGeros RZ, Trautz OR, LeGeros JP, Klein E. Carbonate substitution in the apatite structure. *Bull Soc Chim Fr* 1968; Spec. No.:1712-1718.
 - [19] Heijligers HJ, Driessens FC, Verbeeck RM. Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and strontium hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* 1979;29:127-131.
 - [20] Bigi A, Marchetti F, Ripamonti A, Roveri N. Magnesium and strontium interaction with carbonate-containing hydroxyapatite in aqueous medium. *J Inorg Biochem* 1981;15:317-327.
 - [21] Bohner M, Merkle HP, Lemaitre J. In vitro aging of a calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:155-162.
 - [22] Grover LM, Gbureck U, Young AM, Wright AJ, Barralet JE. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of β -TCP-pyrophosphoric acid bone cement. *J Mater Chem* 2005;15:4955-4962.
 - [23] Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001; 28: 446-453.
 - [24] Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Poser RD. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res* 1998;43:451-461.
 - [25] Grover LM, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2003;24:4133-4141.
 - [26] Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N, Barenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone* 1997;20:47-45.

-
- [27] Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzeler K, Müller FA, Barralet JE. Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes made by 3D powder printing. *Advanced Functional Materials* 2007, 17: 3940-3945.
 - [28] Verberckmoes SC, De Broe ME, D'Haese PC. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney Int* 2003;64:534-543.
 - [29] Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, Cheung KM, Luk KD. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:804-814.

Figures and Tables

Table 1: Compressive strength, apparent densities, strut densities and calculated porosities of strontium containing cements prepared in the β -TCP-MCPM- H_2O system at a powder to liquid ratio of 3.0 g/ml

Sr / (Sr + Ca) ratio	compressive strength [MPa]	apparent density [g/cm^3]	strut density [g/cm^3]	porosity [%]
0	5.0 ± 1.0	1.37 ± 0.07	2.82 ± 0.01	51.3
6.7	7.0 ± 2.0	1.31 ± 0.03	2.75 ± 0.05	52.3
13.3	5.0 ± 1.0	1.30 ± 0.07	2.72 ± 0.03	52.2
20.0	6.0 ± 1.0	1.35 ± 0.04	2.64 ± 0.07	49.0
26.7	6.0 ± 1.0	1.40 ± 0.05	2.96 ± 0.02	52.7
33.3	5.0 ± 1.0	1.46 ± 0.06	2.97 ± 0.03	50.8

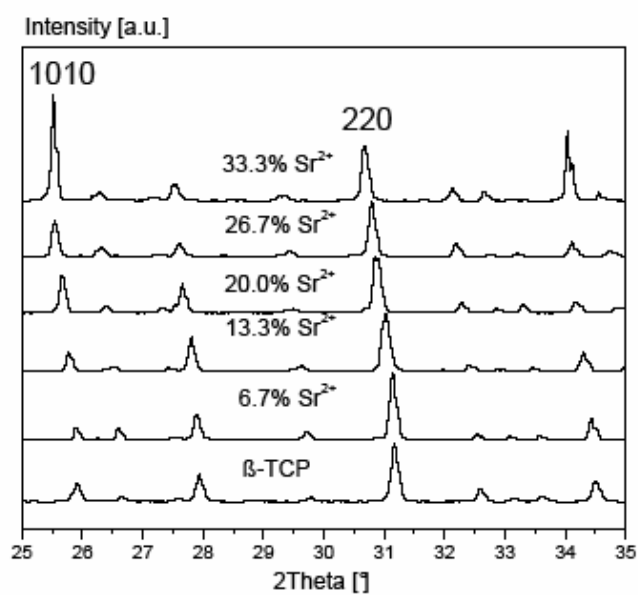


Figure 1. X-ray diffraction patterns of β -TCP prepared with strontium substitution for calcium

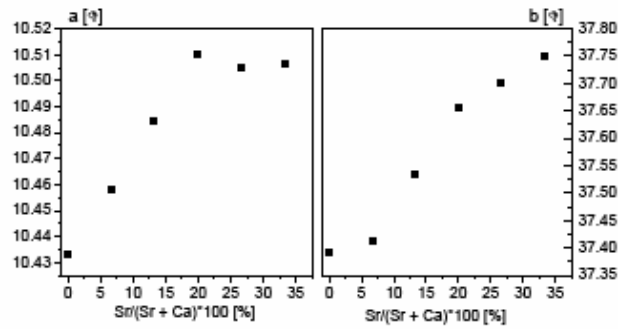


Figure 2: Lattice parameters a and b of Sr^{2+} -substituted β -TCP according to Rietveld refinement analysis

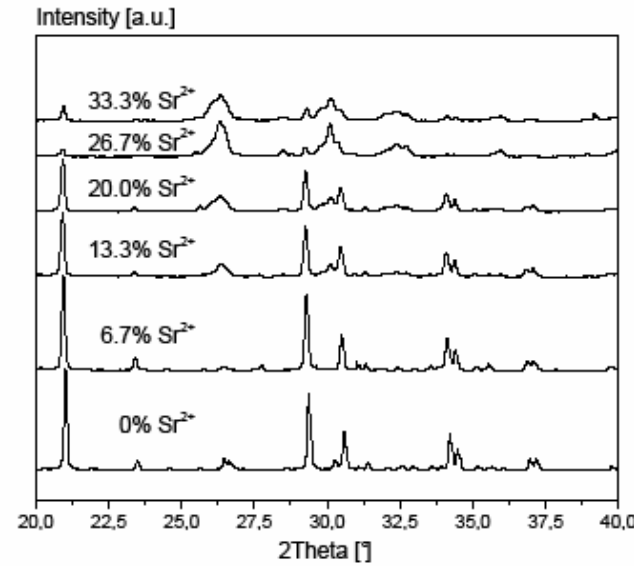


Figure 3: X-ray diffraction patterns of CPC prepared with strontium substituted β -TCPs and MCPM

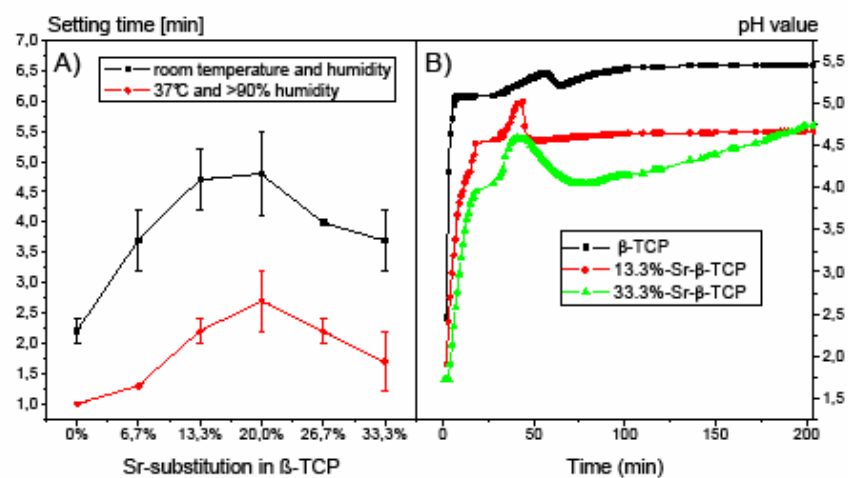


Figure 4: Final setting time (FST) and pH value of CPCs prepared from β -TCP with strontium substitution for calcium of 0% - 50% and $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$.

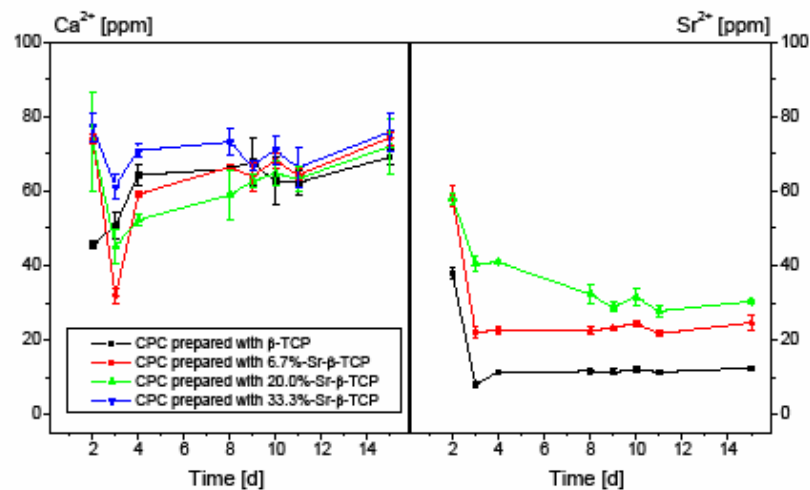


Figure 5: Ca^{2+} and Sr^{2+} concentrations in the ageing medium of CPC prepared with β -TCP, 6.7%-Sr- β -TCP, 20.0%-Sr- β -TCP and 33.3%-Sr- β -TCP after dynamic ageing for 15 days.

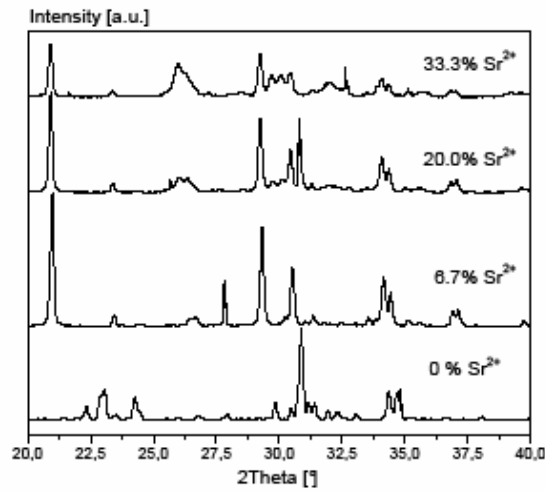


Figure 6. X-ray diffraction pattern of CPC prepared with β -TCP with various strontium contents after being aged dynamically for 15 days

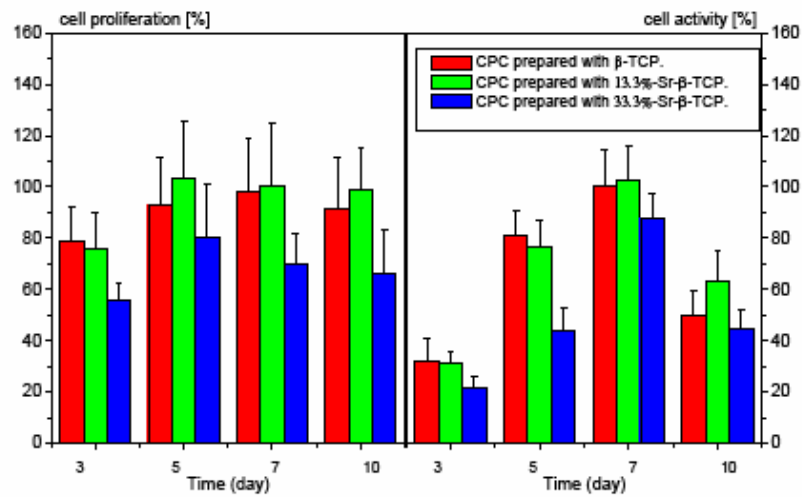


Figure 7. hFOB1.19 cell proliferation and activity grown on CPCs prepared with β -TCP, 13.3%-Sr- β -TCP and 33.3%-Sr- β -TCP.